Untersuchungen zum Mechanismus der Asparaginase aus Escherichia Coli

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
beim Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Klaus-Heinrich Röhm
aus Stuttgart

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck E. Symon · 355 Marburg/Lahn · Friedrichstr. 3

Untersuchungen zum Mechanismus der Asparaginase aus Escherichia Coli

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
beim Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Klaus-Heinrich Röhm
aus Stuttgart

Marburg/Lahn 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Chemie als Dissertation angenommen am 3. 5. 1972.

Berichterstatter: Prof. Dr. Fr. Schneider

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 5. 1972

Gedruckt mit Unterstützung des Marburger Universitätsbundes

INHALTSÜBERSICHT

1	Einleitung	
1.1	Historischer Rückblick	Seite 1
1.2	Asparaginase aus E. coli	
1.2.1	Struktur	2
1.2.2	Zusammensetzung	3
1.2.3	Katalytische Aktivität	4
1.2.4	Kinetik und Mechanismus	6
2	Material und Methoden	
2.1	Geräte	12
2.2	Chemikalien	13
2.3	Synthesen	15
2.4	Enzym	17
2.5	Analytische Methoden	
2.5.1	Proteinbestimmung	18
2.5.2	Disk-Elektrophorese	18
2.5.3	Bestimmung der Enzymaktivitäten	18
2.6	Auswertung, Nomenklatur von kin. Größen	26
3	Kinetik	
3.1	Substratspezifität	28
3.2	Kompetitive Inhibitoren	33
3.3	Nicht kompetitive Inhibitoren	34
3.4	Enzymatische Synthese von Asparagin	37
3.5	Kinetik der Hydroxylaminolyse	39
3.6	Isotopeneffekte in D_2O	50
4	Chemische Modifizierung des Enzyms	
4.1	N^{α}-Halogenacetylasparagin	54
4.2	Reaktion mit Sulfonylhalogeniden	55
4.3	Modifizierung von Tyrosinresten mit Tetranitromethan	57
4.4	Modifizierung von Histidinresten mit Diäthylpyrocarbonat	62
4.5	Modifizierung von Tyrosinresten mit N-Acetylimidazol	66
4.6	Modifizierung von Histidin-und Tyrosinresten mit Diazotetrazol	67
4.7	Modifizierung von Carboxylgruppen	73
5	Diskussion	77
	Literaturverzeichnis und Anhang	92
	Zusammenfassung	100

1 EINLEITUNG

1.1 Das ungewöhnliche Interesse, das die Asparaginasen (L-Asparagin-amidohydrolasen, EC 3.5.1.1) in den letzten Jahren gefunden haben, geht auf die cytostatische Wirkung einiger Vertreter dieser Gruppe von Enzymen zurück. Auslösend wirkten Arbeiten von BROOME, der zeigen konnte, daß die tumorhemmende Eigenschaft des Meerschweinchenserums einer Asparaginase zuzuschreiben ist [1]. Neben umfangreichen Untersuchungen zum Mechanismus dieser cytostatischen Wirkung und über die Möglichkeiten einer Therapie maligner Neubildungen beim Menschen begann in den darauffolgenden Jahren eine intensive Suche nach weiteren Asparaginasen. Die Geschichte dieser Entwicklung und die Literatur bis zum Jahre 1968 sind in den l.c. 2 und 3 zusammengestellt. Eine Übersicht über in-vivo-Effekte der Asparaginase bietet z.B. l.c. 4 .

1.2 Eine Asparaginase mit besonders ausgeprägter Aktivität gegen Lymphome fanden MASHBURN und WRISTON im Jahre 1964 in Escherichia coli [5]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß E. coli zwei Enzyme mit Asparaginaseaktivität enthält, die sich in Struktur und Substratspezifität unterscheiden und von denen nur eines cytostatisch wirkt [6, 7]. Diese sogenannte "EC 2"-Asparaginase wurde in den Jahren 1968 und 1969 von verschiedenen Arbeitsgruppen in reiner Form isoliert. Mittlerweile sind Verfahren zur Gewinnung des kristallinen Enzyms in großem Maßstab entwickelt worden [8 - 12].

In einem Übersichtsartikel aus dem Jahre 1970 vergleicht WRISTON diese Präparationen und diskutiert den Stand der Kenntnis über die E. coli - Asparaginase [13]. Im Folgenden sollen in eine ähnliche Zusammenfassung auch neuere Ergebnisse einbezogen werden.

Besonders gut charakterisiert sind Präparate von

a) WHELAN und WRISTON [10, 14] aus E. coli B, von

b) ARENS et al. [11] aus E. coli ATCC 9637 ("Asparaginase A") und E. coli ATCC 11303 ("Asparaginase B") sowie von

c) HO et al. [12, 19] aus E. coli B ATCC 13706 .

Sie unterscheiden sich in Struktur und katalytischer Aktivität nur geringfügig voneinander und werden hier zusammenfassend behandelt : Abweichungen in den Eigenschaften einzelner Präparationen werden nur erwähnt, wenn sie qualitativer Natur sind.

1.2.1 Struktur des Enzyms

In neutraler, wässriger Lösung hat das Asparaginasemolekül ein Molekulargewicht von 135 000 $\pm$ 5000 bei einer Sedimentationskonstante von 7,6 S. In allen Präparationen kommen jedoch Aggregate mit höheren Molekulargewichten vor, die verringerte spezifische Aktivität aufweisen. Die Enzyme von ARENS et al. ließen sich in mehrere Isoenzyme auftrennen, die sich jedoch nur in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit unterscheiden. Man nimmt an, daß sie unterschiedlichen Amidgehalt besitzen [11]. In konzentriertem Harnstoff- oder Guanidin • HCl - Lösungen disoziiert das Molekül in Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 34 000. Dabei scheint nur ein Typ von Untereinheiten aufzutreten. Entfernt man das Denaturans, rekonstituiert sich das Enzym wieder, wobei volle enzymatische Aktivität zurückkehrt. WRISTON und Mitarbeiter fanden, daß beim Verdünnen einer 1 %-igen neutralen Enzymlösung und ebenso bei Erhöhung der NaCl-Konzentration neben Molekülen mit Molekulargewichten von 255 000 solche mit Werten von 125 000 und schließlich eine Spezies mit Molekulargewicht 64 000 erscheinen [14]. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren

[15, 10], die selbst bei Enzymkonzentrationen von weniger als 0,01 % keinerlei Dissoziation beobachten konnten. Dagegen tritt bei extremen pH- Werten ($4 > pH > 10$) Spaltung des Moleküls ein. Es entstehen Bruchstücke mit Molekulargewichten um 20 000 [15, 19]. Demnach scheint das Enzym in wässriger Lösung als Tetramer aus 4 identischen Untereinheiten vorzuliegen. Dafür sprechen auch Endgruppenbestimmungen [11], elektronenmikroskopische Untersuchungen [17] und röntgenographische Befunde an Kristallen von Asparaginase A [18]. Im gleichen Sinne interpretieren JACKSON und HANDSCHUHMACHER [20] Bindungsexperimente mit ^{14}C-5-Diazo-4-oxo-norvalin (DONV).

Obwohl die Aminosäureanalyse zeigt, daß zwei Halbcystinreste in einer Untereinheit vorliegen, lassen sich am nativen Enzym keine freien SH-Gruppen nachweisen [11, 21]. Vergleich der Molekulargewichte von Bromcyan-Peptiden vor und nach Oxydation mit Perameisensäure macht es wahrscheinlich, daß jede Untereinheit eine intramolekulare Disulfidbrücke enthält [16].

1.2.2 Zusammensetzung des Enzyms

Das Molekül enthält weder Kohlenhydrate noch Phospholipide. Auch metallfreie Präparationen sind voll aktiv [11]. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse von Aminosäureanalysen stimmen gut überein, wenn man die Resultate auf einen Wert von 34 000 für das Molekulargewicht der Untereinheiten bezieht [10 - 12]. Pro Untereinheit enthält die E. coli - Asparaginase danach unter anderem:

Aminosäure	Try	Cys — Cys (S—S)	His	Tyr	Ser	Glu+) + Asp	Arg + Lys
Reste	1	1	3	11	15	70	21

+) einschließlich Gln und Asn

Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4, 9 .

1.2.3 Katalytische Aktivität

Als physiologische Aktivität wird die Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und Ammoniak angesehen.

Die Enzymeinheit (IU) ist diejenige Aktivität, die unter optimalen Bedingungen aus L-Asparagin pro Minute 1 µMol Ammoniak freisetzt.

Das reine Enzym weist eine spezifische Aktivität von etwa 300 IU / mg Protein auf [11, 12].

1.2.3.1 Substratspezifität (siehe auch Tabelle II)

Außer L-Asparagin werden L-Glutamin mit einer relativen Aktivität von 3 % [6] und D-Asparagin mit einer relativen Aktivität von 7 % [22] gespalten. Diese Nebenaktivitäten beruhen nicht auf einer Verunreinigung der Asparaginase mit Fremdenzymen [22]. Durch eigene Untersuchungen konnten wir zeigen, daß auch L-Asparaginsäure-ß-hydroxamat mit einer Geschwindigkeit hydrolysiert wird, die der der Asparaginhydrolyse vergleichbar ist [23]. Daneben wird L-Asparaginsäure-ß-hydrazid mit einer relativen Aktivität von etwa 1 % umgesetzt. Nicht angegriffen werden L-Isoasparagin, L-Asparaginsäurediamid, DL-α-Chlorsuccinamid und L-Asparaginyl-glycin [23] L-Asp-ß-hydroxamat wurde auch von anderen Autoren als Substrat erkannt [24 - 26].

Als weitere Aktivitäten wurden die Hydrolyse von ß-Cyano-alanin zu Asparaginsäure und Ammoniak [27] und die Umsetzung von 5-Diazo-4-oxo-norvalin (DONV) zur 5-Hydroxyverbindung beschrieben [20]. In jüngster Zeit wurde berichtet, daß Asparaginase L-Asparaginsäure-ß-methylester, D-Glutamin [25], sowie - wenn auch mit

äußerst geringer Geschwindigkeit - L-Asparaginsäure-ß-p-nitroanilid umsetzt [28].

1.2.3.2 Reversible Inhibitoren

Mit Ausnahme von L-Asparaginsäurediamid [23] und CBO-L-Asparagin [27] sind bisher keine kompetitiven Inhibitoren beschrieben worden, die nicht zugleich Substrate des Enzyms sind.

Ammoniak hemmt die Hydrolyse von Asparagin [22, 23] sowie die Hydrolyse des Asp-ß-hydroxamats [23] auf nicht kompetitive Weise. Die Hydroxamathydrolyse wird - ebenfalls nicht kompetitiv - durch Hydroxylamin gehemmt [23].

1.2.3.3 Versuche zur irreversiblen Inaktivierung

Irreversible Inaktivierung konnten HANDSCHUHMACHER und Mitarbeiter mit dem Asparaginanalogen DONV erzielen [20]. Interessant ist dabei, daß auch DONV tumorhemmend wirken soll [29].

Die Acylierung von Asparaginase A mit Dicarbonsäureanhydriden [30] und die Kupplung des Enzyms mit diazotiertem Anilin [31] wirken sich nur wenig auf die Aktivität aus. Dasselbe gilt für die teilweise Desaminierung des Enzyms [32].

NISHIMURA et al. haben an einer Asparaginase aus E. coli HAP ausführliche Experimente zur spezifischen chemischen Modifizierung vorgenommen [21]. Sie fanden, daß weder SH-Reagenzien noch Behandeln mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) die Enzymaktivität beeinträchtigen. Oxydation von 2-3 Tryptophanresten im Molekül senkt die Aktivität auf 40 %, die Modifizierung von 12 Argininresten mit Glyoxal auf etwa 25 %. Mit Tetranitromethan ließen sich 15 Tyrosinreste nitrieren , auch hier blieb beträcht-

liche Restaktivität zurück. Dagegen läßt sich die Aktivität der Asparaginase durch Umsetzung von Aminogruppen mit Monochlor-trifluor-p-chinon (CFQ) vollständig zerstören. NISHIMURA et al. schließen aus der Kinetik der Inaktivierung, daß 4 Aminogruppen des Proteins etwas mit der katalytischen Aktivität zu tun haben.

1.2.4 Kinetik und Mechanismus

Die MICHAELIS-Konstante für L-Asparagin beträgt $1,1 \times 10^{-5}$ M [33, 23, 12]. Dieser recht niedrige Wert erschwert kinetische Untersuchungen mit Asparagin als Substrat. In derselben Größenordnung liegt der K_m-Wert für L-Asparaginsäure-ß-hydrazid [23], während die MICHAELIS-Konstanten für die übrigen bisher beschriebenen Substrate um 1 - 2 Größenordnungen höher sind. (siehe dazu Tabelle II)

Die pH-Abhängigkeit der Hydrolyse von Asparagin ist gekennzeichnet durch ein breites Plateau zwischen pH 5, 5 und 8, 5. Die scheinbaren pH-Werte für die Inaktivierung des Enzyms liegen etwa bei pH 4 und pH 9 [22].

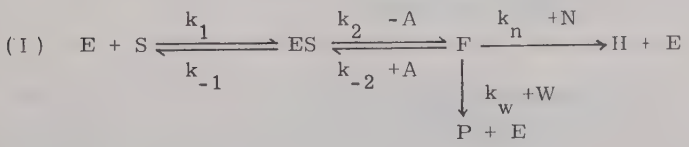
In einer früheren Arbeit haben wir [23] - und unabhängig von uns auch EHRMAN et al. [24] - gefunden, daß kristalline Asparaginase aus E. coli die Synthese von L-Asp-ß-hydroxamat (AHM) aus Asparagin und Hydroxylamin katalysiert. Dies ist bei Amidasen nicht ungewöhnlich.

Schon im Jahre 1950 haben WAELSCH und Mitarbeiter in zellfreien Systemen mit Amidaseaktivität aus verschiedenen Mikroorganismen - darunter auch E. coli - derartige Aspartyl- und Glutamyltransferaseaktivitäten nachgewiesen [34]. MEISTER und Mitarbeiter haben sie 1955 an der Asparaginase aus Meerschweinchenserum [34], DE GROOT und LICHTENSTEIN mit

einem Enzym aus Rattenleber [36] demonstriert.

Die Hydroxylaminolyse von Substraten - katalysiert durch Hydrolasen - bietet einen Zugang zum Mechanismus dieser Enzyme, der sonst kaum gegeben ist, da man Wasser - das zweite Substrat der hydrolytischen Reaktion - nicht in seiner Konzentration variieren kann ohne gleichzeitig unübersichtliche und kaum quantifizierbare Einflüsse auf die Enzymstruktur auszuüben. Dies trifft für Hydroxylamin als Acceptor nicht in diesem Ausmaß zu.

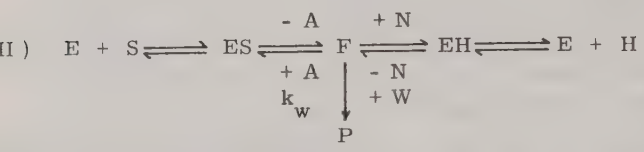
Die Kinetik der gleichzeitigen Hydrolyse und Hydroxylaminolyse von Ester- und Amidsubstraten ist beim α-Chymotrypsin ausführlich untersucht worden (vgl. z.B. [37 - 39]). Ausgehend von ähnlichen Experimenten haben wir [23] sowie EHRMAN et al. [24] einen Mechanismus für die E. coli - Asparaginase formuliert, der die Abspaltung von Ammoniak aus dem ES-Komplex unter Bildung eines Zwischenprodukts postuliert, mit dem dann in einem weiteren Schritt Wasser, Hydroxylamin oder andere Nucleophile zu den Produkten reagieren. Schematisch kann man schreiben:



Dabei bedeutet :

S = L - Asparagin
A = Ammoniak
P = L - Asparaginsäure
N = Hydroxylamin
H = L - Asp - ß - hydroxamat
W = Wasser

Das Schema ist insofern vereinfacht, als die EH- und EP-Komplexe weggelassen und die zu den Produkten P und H führenden Schritte irreversibel angesetzt sind, was für beide Teilreaktionen nicht zutrifft. Kinetische Analysen des Mechanismus



sind z. B. von ARION und NORDLIE [40] und von FOLK [41] ausgearbeitet worden. Wir gehen jedoch im Folgenden von Mechanismus I aus, da er übersichtlichere steady-state-Gleichungen liefert als II, aus denen sich aber alle wichtigen kinetischen Konsequenzen eben - so ableiten lassen, wie aus II. Zudem haben wir bei unseren Experimenten meist Bedingungen gewählt, unter denen die vernachlässigten Rückreaktionen quantitativ keine Rolle spielen.

Reaktionen mit H als Substrat lassen sich ebenfalls durch Mechanismus I beschreiben, wenn man S durch H und A durch N ersetzt.

Unter steady - state Bedingungen ergibt sich aus Mechanismus I für die Konzentration des Zwischenprodukts F [+)]

$$(III)\quad [F] = \frac{\dfrac{k_2[E]_o}{k_2 + k'_w + k_n[N] + k_{-2}[A]} \cdot [S]}{[S] + \dfrac{k_{-1}\left(k'_w + k_n[N] + k_{-2}[A]\right) + k_2\left(k'_w + k_n[N]\right)}{k_1\left(k_2 + k'_w + k_n[N] + k_{-2}[A]\right)}}$$

Da [W] konstant ist, ist $k_w[W]$ zur Konstanten k'_w zusammengefaßt.

+) Zur Ableitung der Gleichung siehe Anhang S. 98

Die Geschwindigkeit der Hydrolyse d [P] / dt ergibt sich dann als

(IV) $$v_w = d[P]/dt = k'_w[F]$$

die des Transfers als

(V) $$v_n = d[P]/dt = k_n[N][F]$$

1. Eine wichtige Konsequenz des postulierten Mechanismus ist, daß NH_2OH die Umsetzung, gemessen als $-d[S]/dt = (v_n + v_w)$ hemmt, wobei formal ein unkompetitiver Hemmtyp beobachtet werden sollte.

Aus (III) - (V) folgt nämlich

(VI) $$v_w + v_n = \frac{\dfrac{k_2 \left(k_n[N] + k'_w\right) \cdot [E]_o}{\left(k_2 + k'_w + k_n[N]\right)} \cdot [S]}{[S] + \dfrac{\left(k_n[N] + k'_w\right)}{\left(k_2 + k'_w + k_n[N]\right)} \cdot K'_{sh}}$$

wobei $K'_{sh} = (k_{-1} + k_2) / k_1$. Der Quotient aus der formalen MICHAELIS-Konstante und der Maximalgeschwindigkeit und damit die Steigung der Geraden im LINEWEAVER - BURK - Diagramm sind also unabhängig von [N]. EHRMAN et al. haben dies bestätigt [24].

2. Für die Geschwindigkeit v_n erhält man aus (III) und (V) den Ausdruck

$$(\text{VII}) \quad v_n = \frac{\dfrac{k_2[E]_o}{\left(1 + \dfrac{K'_{sh}}{[S]}\right)} \cdot [N]}{[N] + \dfrac{k_2 + k'_w \left(1 + \dfrac{K'_{sh}}{[S]}\right) + k_{-2}\left(1 + \dfrac{K_s}{[S]}\right)[A]}{k_n \left(1 + \dfrac{K'_{sh}}{[S]}\right)}}$$

mit $K_s = k_{-1} / k_1$

Bei Sättigung mit Asparagin ist $[S] \gg K'_{sh}$ und $[S] \gg K_s$

In Abwesenheit von A ist die formale MICHAELIS-Konstante für NH_2OH bei der Transfer-Reaktion demnach

$$(\text{VIII}) \qquad K_{nt} = \frac{k_2 + k'_w}{k_n}$$

Gleichzeitig ist bei hohen [S] das gemessene $v_w \approx V_{sh}$, also näherungsweise gleich der Maximalgeschwindigkeit der Asparaginhydrolyse. In Abwesenheit von A und N gilt

$$(\text{IX}) \qquad V_{sh} = \frac{k_2 k'_w}{k_2 + k'_w} \cdot [E]_o$$

In Gegenwart von N

$$(\text{X}) \qquad V_{insh} = \frac{V_{sh}}{\left(1 + \dfrac{[N]}{K_{insh}}\right)} = \frac{k_2 k'_w}{k_2 + k'_w + k_n[N]} \cdot [E]_o$$

Aus (IX) und (X) ergibt sich, daß

$$(XI) \qquad K_{insh} = \frac{k_2 + k'_w}{k_n} = K_{nt}$$

Die formale MICHAELIS-Konstante K_{nt} und die Hemmkonstante K_{insh} sollten daher bei gleichzeitiger Hydrolyse und Hydroxylaminolyse von Asparagin denselben Zahlenwert haben. Wir haben gefunden, daß dies für die E. coli-Asparaginase bei pH 7,8 zutrifft [23].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden

a) die analytischen Methoden zur Bestimmung von Asparaginaseaktivitäten zu erweitern und zu verbessern

b) neue Substrate und Inhibitoren aufzufinden

c) durch kinetische Untersuchungen und Modellreaktionen weitere Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus der E. coli Asparaginase - insbesondere über die Natur des postulierten Zwischenprodukts F - zu erhalten und

d) durch selektive chemische Modifizierung des Enzyms die Rolle einzelner Aminosäuren im katalytischen Prozess zu klären.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Spektralphotometer

BECKMAN, Modell Acta III, mit automatischem Probenwechslersystem
ZEISS PMQ II mit T/E-Wandler und Potentiometerschreiber METRAWATT RE 511

pH-Meter

RADIOMETER PHM 26 oder PHM 28 mit Einstabmeßkette INGOLD G 05438, für Volumina unter 5 ml wurde die Einstabelektrode METROHM EA 147 U benutzt.

pH-Stat

Es wurde das pH-Meter PHM 26 kombiniert mit dem Titrator TTT 11, der Bürette ABU 1 und dem Schreiber SBR 2 (alle Geräte RADIOMETER, Kopenhagen) verwendet. In einem Reaktionsgefäß mit Temperiermantel wurden bei einem Probenvolumen von 2ml die Glaselektrode G 2222 C und die Kalomelektrode K 4112, beide von RADIOMETER, eingesetzt.

Thermostate

MWG LAUDA WB 20 S8 oder MWG LAUDA K 2 RD

Disk-Elektrophorese

Analytische und präparative Disk-Elektrophoresen wurden mit einem von ST. NEES und W. SCHMIDT entwickelten Flachgel-Apparatur durchgeführt. Gel-Dimensionen: 5 x 150 x 150 mm. Das Stromversorgungsgerät (maximal 150 mA bei 1kV, Strom und Spannung getrennt regelbar) wurde von J. BALDUF, Marburg gebaut. Kühlung

durch den Kryostaten MWG LAUDA K 2 RD. Peristaltische Pumpe: LKB 10 200 "Perpex" Fraktionssammler: LKB "Radi Rac", beide Geräte von LKB Produkter, Stockholm.

Densitogramme der angefärbten Gele wurden mit dem "Discolumeter"-Zusatz zum Photometer ZEISS PMQ II aufgenommen.

Polarimeter

PERKIN ELMER 141

Schmelzpunkte

wurden mit dem Gerät nach TOTTOLI, Fa. Büchi, Flawil, bestimmt.

2.2 CHEMIKALIEN

2.2.1 Asparaginsäurederivate und Analoge des Asparagins

L-Asparagin · H_2O, f. biochem. Zwecke	MERCK, Darmstadt
L-Asparaginsäure, f. biochem. Zwecke	"
L-Glutamin, f. biochem. Zwecke	"
D-Asparagin · H_2O, puriss.	FLUKA, Buchs
α, ß-Diaminopropionsäure · HCl	HOFFMANN-LA ROCHE, Basel
α,γ-Diaminobuttersäure · HCl	"

2.2.2 Analytische Reagenzien

α-Ketoglutarsäure	BOEHRINGER, Mannheim
NADH, di-Na-Salz	"
Aspartat-Aminotransferase (GOT)	"
Malat-Dehydrogenase (MDH)	"
Glutamat-Dehydrogenase (GDH)	"
8-Hydroxychinolin, p. a.	MERCK, Darmstadt
Ammoniumheptamolybdat, p. a.	"

$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, p. a.	MERCK, Darmstadt
p-Dimethylamino-benzaldehyd, p. a.	"
FOLIN-CIOCALTEU-Phenolreagenz	"
Perchlorsäure, etwa 70 %, p. a.	"
Morpholinoäthansulfonsäure, p. a.	SERVA, Heidelberg
Morpholinopropansulfonsäure, p. a.	"
N, N-Bis-(2-hydroxyäthyl)glycin (BICIN) p. a.	"

2.2.3 Reagenzien zur Disk-Elektrophorese

Acrylamid, reinst	SERVA, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau G 250	"
N, N'-Methylen-bis-acrylamid	SCHUCHARDT, München
N, N', N'', N'''-Tetramethyläthylendiamin	"
Riboflavin, f. biochem. Zwecke	MERCK, Darmstadt
Amidoschwarz 10 B	"

2.2.4 Modifizierungsreagenzien

Benzylsulfonylfluorid, reinst	SERVA, Heidelberg
5-Dimethylamino-1-naphthalin-sulfonylchlorid (Dansylchlorid), p. a.	"
Acetylimidazol, f. biochem. Zwecke	MERCK, Darmstadt
1-Cyclohexyl-3-(2-morpholino-äthyl) carbodiimid (CMC)	"
5-Aminotetrazol $\cdot H_2O$, purum	FLUKA, Buchs
Tetranitromethan, p. a.	"
Diäthylpyrocarbonat ("Baycovin")	BAYER, Leverkusen
Glycin-1-^{14}C-äthylester $\cdot$ HCl 6 mC / mMol	NEN Chemicals, Ffm.

2.2.5 Sonstige Chemikalien

Hydroxylamin $\cdot$ HCl, p. a.	RIEDEL DE HAEN, Seelze

Naphthalin-1,8-dicarbonsäure-anhydrid, 97 %	SCHUCHARDT, München
2,2,2-Trifluoräthanol	"
Phthalsäureanhydrid	MERCK, Darmstadt

Die Puffersubstanzen waren in p. a.-Qualität von MERCK, Darmstadt.

2.3 SYNTHESEN

2.3.1 Asparaginsäurederivate und Analoge des Asparagins

L-Asparaginsäure-ß-hydroxamat	nach l. c.	[42]
L-Asparaginsäure-ß-methylamid		[43]
L-Asparaginsäure-ß-hydrazid		[44]
L-Asparaginsäure-ß-methylester · HCl		[45]
L-Asparaginsäure-dimethylester · HCl		[46]
L-Asparaginsäurediamid · HCl		[47]
CBO-L-Asparaginsäure		[45]
DL-α-Chlorsuccinamid		[36]
DL-N^{α}-Äthylasparagin		[36]
L-Isoasparagin		[48]
L-N^{α}-Chloracetylasparagin		[49]
Glycyl-L-Asparagin		[49]
L-Asparaginyl-glycin		[50]

CBO-L-Asparagin, CBO-L-Isoasparagin, L-Asparaginsäure-ß-benzylester und CBO-S-Benzyl-Cystein wurden von Herrn Dipl-Biochem. E. Schaich zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Weitere Synthesen

2. 3. 2. 1 CBO-L-Isoasparagin-p-nitrophenylester

3 g CBO-L-Isoasparagin und die äquimolare Menge p-Nitrophenol wurden in 30 ml abs. DMF gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung wurde die äquimolare Menge Dicyclohexylcarbodiimid in 30 ml DMF zugetropft. Es wurde über Nacht weitergerührt, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die Lösung in 500 ml ges. NaCl-Lösung gegossen. Nach einigem Stehen in der Kälte wurde das Produkt abgesaugt und zweimal aus Äthanol umkristallisiert.

Schwach gelbliche Kristalle, Fp. 149 - 152° C.

2. 3. 2. 2 N-(2-Aminoäthyl)-naphthalin-1, 8-dicarbonsäuremonoamid

wurde nach l. c. 51 aus Naphthalsäureanhydrid und Äthylendiamin dargestellt. +)

N-(2-Aminoäthyl)-phthalsäuremonoamid

wurde in analoger Weise aus Phthalsäureanhydrid gewonnen, jedoch mit Benzol als Lösungsmittel. +)

Beide Verbindungen cyclisieren beim Erhitzen in hochsiedenden organischen Lösungsmitteln. Da sie zudem in den meisten Solventien schwerlöslich sind, wurden sie nicht umkristallisiert. Beide Produkte waren jedoch bei der Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel : Butanol : Eisessig-Wasser 4 : 1 : 1) einheitlich und wiesen den erwarteten Stickstoffgehalt auf.

N-Acetyltyrosinamid, N-Acetyl-L-histidin und Glycyl-L-histidyl-L-leucin stellte Herr Prof. Dr. Fr. Schneider zur Verfügung.

+) Für die Durchführung der Synthese danke ich Herrn Dipl. -Biochem. E. Schaich.

2.4 ENZYM

Der größte Teil der kinetischen Experimente wurde mit einer von BOEHRINGER, Mannheim bezogenen Asparaginasepräparation durchgeführt, deren spezifische Aktivität mit 220 U / mg angegeben wird. Das Enzym wird als Kristallsuspension in 3 M Ammoniumsulfat geliefert. Es wurde vor dem Gebrauch durch Dialyse gegen 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5 von Ammoniumionen befreit (Visking-Dialysierschlauch, SERVA, Heidelberg) und die Lösung bei $-25^{\circ}C$ gefroren gelagert. Nach der Dialyse fanden wir eine spezifische Aktivität von 240 - 260 U / mg.

Für die Modifizierungsexperimente und eine Reihe von kinetischen Untersuchungen haben wir Asparaginase A (Lot: A 16/70 s 1 L) [11] der Firma BAYER mit einer spezifischen Aktivität von 260 U / mg verwendet.

Beide Präparate waren in der analytischen Disk-Elektrophorese nicht voneinander zu unterscheiden (siehe Abb. 1 und 19) und zeigten identische Substratspezifität.

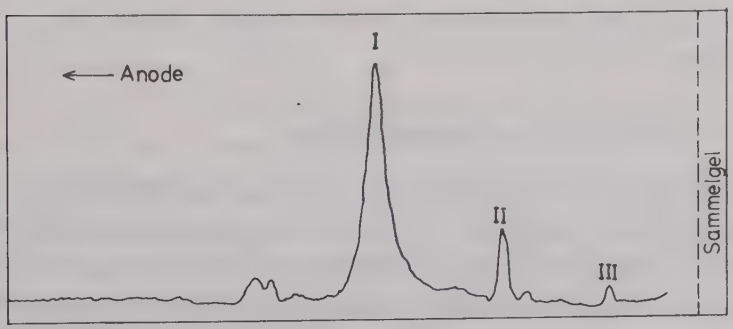


Abb. 1 Analytische Disk-Elektrophorese der E. coli Asparaginase
50 µg Enzym (BOEHRINGER) wurden in einem 2%-igen Polyacrylamidgel bei pH 9,0 aufgetrennt. Densitogramm eines mit Amidoschwarz angefärbten Gels. Die Banden II und III sind ebenfalls enzymatisch aktiv. Vgl. [11, 12]

2.5 ANALYTISCHE METHODEN

2.5.1 Proteinbestimmung

Die Enzymkonzentrationen wurden im allgemeinen aus der Extinktion bei 278 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge beträgt die Extinktion einer 0,1 %-igen neutralen Asparaginaselösung 0,74 [11]. Wir haben für die uns zur Verfügung stehende Asparaginase A einen Wert von 0,73 gefunden.

Die nach der Mikrobiuretmethode [52] bestimmten Konzentrationen stimmen mit den Werten aus der UV-Absorption gut überein, während die Methode nach LOWRY [53] stark abweichende Werte liefert, wenn man Serumalbumin vom Rind zur Erstellung der Eichkurve verwendet.

2.5.2 Disk- Elektrophorese

Die Zusammensetzung der Gele und Puffer entsprach dem von MAURER [54] angegebenen "System 1". Die Gele wurden mit Amidoschwarz 10B oder Coomassie Brilliant Blau G 250 angefärbt, die mit Amidoschwarz behandelten Gele wurden elektrolytisch entfärbt.

2.5.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden, wenn nicht anders angegeben, pro Ansatz etwa 0,1 bis 0,5 Enzymeinheiten in 1 ml 0,05 M Triäthanolamin - oder TRIS-Puffer, pH = 7,5, mit Substrat (im allgemeinen mit L-Asparagin in einer Konzentration von 5mM) bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,1 ml 2 N Perchlorsäure beendet. Nach 20 min Stehen im Eisbad wurde mit 0,1 ml 2 N KOH neutralisiert und in einem Aliquot des Überstandes die quantitative Bestimmung der Produkte vorgenommen. Die Spontanhydrolyse der Substrate ist unter diesen Bedingungen nur gering.

Gelegentlich wurden Aktivitäten nach der kinetischen Methode (siehe unten) im enzymatischen Test bestimmt, insbesondere bei kleinen Substratkonzentrationen.

2.5.3.1 Bestimmung von Asparaginsäure

Asparaginsäure wurde im gekoppelten Test mit Aspartat-Aminotransferase (GOT) und Malat-Dehydrogenase (MDH) nach l. c. 55 bestimmt.

$$\text{Aspartat} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{Glutamat} + \text{Oxalacetat}$$

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Malat} + \text{NAD}^{\oplus}$$

Meßgröße ist die Abnahme der Extinktionen von NADH bei 340 nm.

Stammlösungen von α-Ketoglutarat (0,1 M, neutral) und NADH (6,6 mM in $NaHCO_3$-Puffer, pH = 10) wurden in kleinen Portionen gefroren bei $-18^{\circ}C$ aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut. GOT und MDH wurden als Kristallsuspension in 3 M Ammoniumsulfat eingesetzt.

a) Endpunktsmethode

Die Testansätze enthielten bei 37° C in 3 ml TRIS-Puffer (0,05 M, pH = 7,5) α-Ketoglutarat (6,7 mM), NADH (0,22 mM), MDH (25 U), GOT (10 U) und die asparaginsäurehaltige Probe ($<$ 0,5 μMol). Der Ansatz wurde zunächst ohne GOT temperiert, dann wurde die Extinktion bei 340 nm einige Minuten lang registriert, die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl GOT gestartet und die Extinktion bis zur Konstanz weiterregistriert. Die Gesamtänderung der Extinktion ist dann proportional zur Menge Asparaginsäure in der Probelösung.

b) Kinetische Methode

Hier enthielt die Meßlösung zusätzlich Substrat (z. B. Asparagin

oder L-Asp-ß-methylamid). Gestartet wurde mit Asparaginase (0,05 IU oder weniger) und wie oben beschrieben die E_{340} registriert. Unter den Bedingungen des Tests (mehr als zweihundertfacher Überschuss der Aktivität der Indikatorenzyme) stellt sich nach wenigen Sekunden lineare Extinktionsabnahme ein, deren Geschwindigkeit der Asparaginaseaktivität proportional ist. Dies wurde durch erneuten Zusatz der gleichen Menge Asparaginase überprüft. Die Reaktion wurde abgebrochen, wenn 20 - 30 % des vorgelegten NADH oxydiert waren.

2.5.3.2 Bestimmung von Ammoniak

a) die Hydrolyse von Substraten, die keine Asparaginsäure liefern, wurde anhand der Freisetzung von NH_3 verfolgt, das ebenfalls enzymatisch mit Glutamat-Dehydrogenase (GDH) bestimmt wurde (siehe l.c. 56). Die Ansätze enthielten in 3,0 ml TRIS-Puffer (0,1 M, pH = 8,0), α-Ketoglutarat (10 mM), NADH (0,22 mM) und die Probe mit $<$ 0,5 μMol NH_3. Gestartet wurde 50 μl GDH (4 - 5 U) in 50 % Glycerin.

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + NH_3 + NADH + H^{\oplus} \xrightarrow{GDH} \text{Glutamat} + NAD^{\oplus} \quad (+ H_2O)$$

Da sich die Testlösung bei höherer Temperatur gelegentlich trübt, wurde meist bei 30° C gearbeitet. Die Meßwerte müssen um den NH_3-Gehalt der GDH-Präparationen korrigiert werden.

b) Auch bei diesem Test wurde gelegentlich nach der kinetischem Methode (siehe oben) gearbeitet.

2.5.3.3 Bestimmung von Hydroxylamin

Das bei der Hydrolyse von L-Asp-ß-hydroxamat freigesetzte Hydroxylamin wurde nach FREAR und BURRELL [57] bestimmt. In mäßig

alkalischer Lösung wird Hydroxylamin mit 8-Hydroxychinolin (Oxin) und Luftsauerstoff zu einem stabilen grünen Farbstoff vom Indooxin-Typ umgesetzt, der ein Absorptionsmaximum bei 705 nm aufweist. Bei dieser Wellenlänge finden wir einen molaren Extinktionskoeffizienten von $19,9 \cdot 10^3$ $1 \cdot Mol^{-1} cm^{-1}$ während sich aus den l. c. 57 angegebenen Daten ein Wert von $15,5 \cdot 10^3$ $1 \cdot Mol^{-1} cm^{-1}$ ergibt.

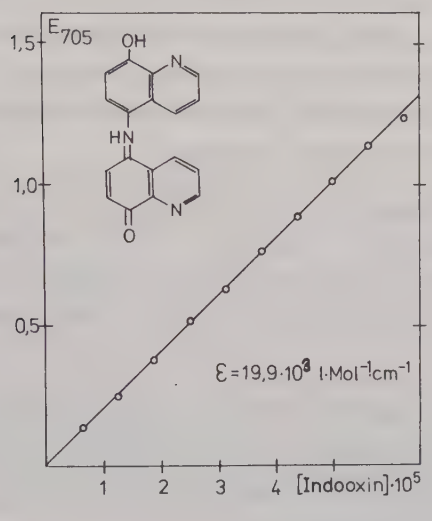


Abb. 2 Eichkurve zur NH_2OH Bestimmung
Die Meßpunkte sind Mittelwerte aus 3 Einwaagen. Der Extinktionskoeffizient wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden berechnet. NH_2OH-Stammlösung und Ausführung der Tests wie in l. c. 57 beschrieben.

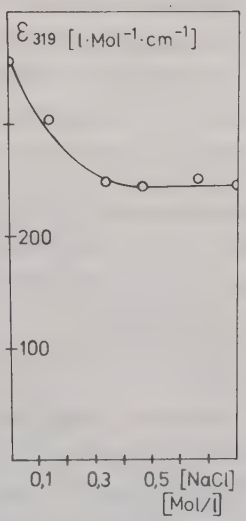


Abb. 4 Abhängigkeit des ε_{319} des AHM-Molybdat-Komplexes von der NaCl-Konzentration
MOPS-Puffer, pH 7,0.
Siehe 2. 5. 3. 4

2. 5. 3. 4 Bestimmung von L-Asp-ß-hydroxamat mit Molybdat

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß Hydroxamsäuren mit Molybdat Komplexe bilden, die in neutraler Lösung stabil sind und starke UV-Absorption aufweisen. So sind z. B. die Molybdatkomplexe von Salicylhydroxamsäure [58] und Nicotinohydroxamsäure [59] zur quantitativen Bestimmung von Molybdat verwendet worden.

Wir haben die Komplexbildung mit Molybdat zur Bestimmung von L-Asparaginsäure-ß-hydroxamat (AHM) bei neutralen pH-Werten ausgenutzt. Dieser Test ist empfindlicher als der Eisenchlorid-Test (siehe 2. 5. 3. 5) und bietet die Möglichkeit, die enzymatische Synthese von AHM kontinuierlich im Photometer zu verfolgen.

Reagenzien. Als Puffersubstanzen sind die von GOOD et al. [60] eingeführten Morpholinoäthansulfonsäure (MES, pK_a = 6,15), Morpholinopropansulfonsäure (MOPS, pK_a = 7,2) und N,N-Bis-(2-hydroxyäthyl)-glycin (BICIN , pK_a = 8,4), die nur geringe Neigung zur Komplexbildung aufweisen, gut geeignet.

Das Molybdatreagenz bestand aus einer 2mM Lösung von Ammoniummolybdat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\,H_2O$ in 0,05 M MES-, MOPS- oder BICIN-Puffer. Die enzymatische Hydrolyse von Asparagin wird durch Molybdat in dieser Konzentration nicht gehemmt.

Spektren. Spektren des AHM-Molybdat-Komplexes bei verschiedenen pH-Werten zeigt die Abb. 3.

Die Lage der Absorptionsmaxima und die Extinktionskoeffizienten sind im untersuchten Bereich pH-abhängig. Möglicherweise geht dies auf eine Änderung der Zusammensetzung des Komplexes - die wir nicht untersucht haben - zurück. Bei 319 nm ist jedoch der Extinktionskoeffizient zwischen pH 6 und 8 pH-unabhängig.

Extinktionskoeffizienten. Die Extinktionskoeffizienten sind auf die AHM-Konzentration in der Meßlösung bezogen, da wir die Stöchio-

metrie des Komplexes nicht geklärt haben. Sie fallen mit steigender Ionenstärke wie aus Abb. 4 hervorgeht, erreichen aber bei NaCl-Konzentrationen von mehr als 0,3 M einen konstanten Endwert von 250 $1\ Mol^{-1} cm^{-1}$.

Das LAMBERT-BEERsche Gesetz ist für Asp-ß-hydroxamat bis zu $E_{319} = 3,0$ erfüllt.

Hydroxylamin in Konzentrationen bis mindestens 0,4 M hat keinen Einfluß auf den Extinktionskoeffizienten bei 319 nm, wenn man die Ionenstärke konstant hält. Bei allen Bestimmungen muß allerdings gegen einen Reagenzienleerwert gemessen werden.

Die enzymatische Synthese des Hydroxamats wurde kontinuierlich anhand der Zunahme der Extinktion bei 319 nm verfolgt.

2 ml Molybdatreagenz mit Asparagin (5-10 mM) wurden im temperierbaren Küvettenhalter in Küvetten auf die Meßtemperatur gebracht. Dann wurde x µl ($x \leq 500$) einer 2 M Hydroxylaminlösung desselben pH-Werts (2 N an NaCl) und (500 - x) µl 2 N NaCl zugegeben, was zu einer NaCl-Endkonzentration von 0,4 N führt. Hierauf wurde die Extinktion gegen einen ebenso hergestellten Leerwert einigen Minuten lang registriert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzymlösung (10 bis 20 µl) in die Probenküvette gestartet.

Ein typisches Experiment ist in Abb. 5 dargestellt. Zunächst steigt die E_{319} infolge der Synthese von Hydroxamat an und erreicht nach einiger Zeit ein Maximum, dessen Lage bei gegebener Asparaginkonzentration von $[E]_o$ und dessen Höhe von der NH_2OH-Konzentration abhängt. Der anschließende Extinktionsabfall geht auf die enzymatische Hydrolyse von Asp-ß-hydroxamat zurück. Offensichtlich setzt das Enzym auch den Molybdatkomplex um, die Geschwindigkeit dieses Prozesses nimmt erwartungsgemäß wie die der Synthese des Hydroxamats mit $[E]_o$ zu.

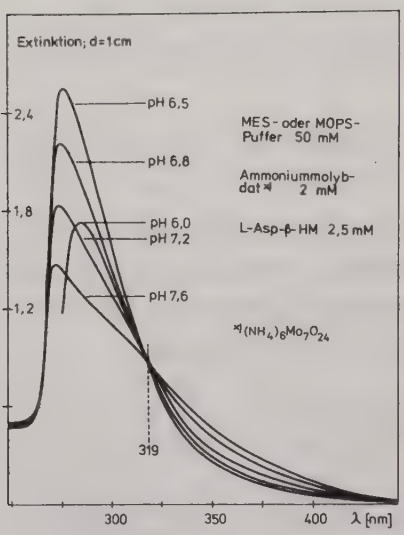


Abb. 3 Spektren des Molybdatkomplexes von Asp-ß-hydroxamat
Vgl. 2.5.3.4, S. 22

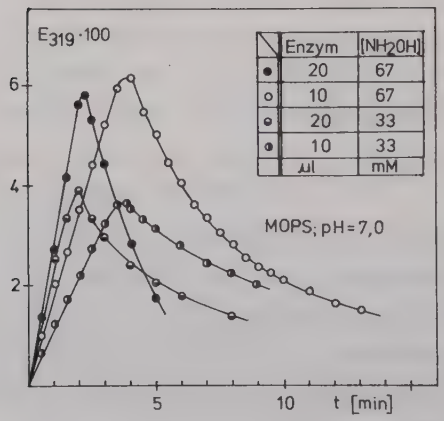


Abb. 5 Bestimmung von v_n nach der Molybdatmethode
Vgl. 2.5.3.4, S. 23

Aus dem linearen Abschnitt des Extinktionsanstiegs wurden die Anfangsgeschwindigkeiten $v_{n(o)}$ graphisch ermittelt.

2.5.3.5 Bestimmung von L-Asp-ß-hydroxamat mit $FeCl_3$

Das $FeCl_3$-Reagenz nach l. c. 61 bestand aus einer 5%-igen Lösung von $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ in 3 N HCl. 1 ml Probelösung wurden mit 2 ml Reagenz gemischt und die Extinktion bei 510 nm gegen einen Reagenzienleerwert bestimmt.

Der Extinktionskoeffizient des Fe (AHM $)_3$-Komplexes bei 510 nm wurde mit der von uns synthetisierten AHM-Präparation in Übereinstimmung mit l. c. 24 als 950 $1 \cdot Mol^{-1} cm^{-1}$ bestimmt.

2.5.3.6 Bestimmung von Hydrazin

Das bei der Hydrolyse von L-Asp-ß-hydrazid freigesetzte Hydrazin wurde wie in l. c. 23 beschrieben mit EHRLICHs-Reagenz photometrisch bestimmt.

2.5.3.7 Aktivitätsbestimmung mit Estersubstraten

Die Hydrolyse des ß-Methylesters wurde nach der pH-Stat-Technik in 2 ml 0,1 NaCl verfolgt. Da der Ester schon bei pH 7 beträchtliche Spontanhydrolyse zeigt, wurde das Substrat als Hydrochlorid erst kurz vor dem Beginn des Tests in eiskalter 0,1 N NaCl gelöst, mit kalter 2 N NaOH auf den gewünschten pH-Wert gebracht und dann schnell auf Versuchstemperatur erwärmt.

Bei pH-Werten von 8 und höher läßt sich auch die Hydrolyse des ß-Hydroxamates nach diesem Verfahren ohne Korrektur messen, da das gebildete Hydroxylamin dann keine Protonen mehr aufnimmt. Allerdings beeinträchtigt die Labilität von NH_2OH in alkalischer Lösung den Wert dieser Methode.

2.6 AUSWERTUNG DER EXPERIMENTE, NOMENKLATUR KINETISCHER GRÖSSEN

Die gemessenen Aktivitäten sind im allgemeinen auf die Enzymmenge (mg oder µg) bezogen, stellen also spezifische Aktivitäten dar. Die Daten wurden meist in LINEWEAVER-BURK-Diagrammen doppelt reziprok aufgetragen. Die kinetischen Parameter wurden daraus nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet.

Bei kompetitiven Inhibitoren wurden aus Diagrammen nach HUNTER und DOWNS [62] die Größen $K_{I(Inh.)} / K_{m(Substr.)}$, die sich aus der Steigung der erhaltenen Geraden ergeben, ermittelt. Die Hemmkonstanten für nicht kompetitive Hemmstoffe wurden wie üblich aus den Ordinatenabschnitten nach $V_{max(I)} = V_{max} / (1 + ([I]/K_I))$ berechnet.

Die kinetischen Größen haben die folgenden Bedeutungen:

v_w Geschwindigkeit der Hydrolyse, gemessen als $\triangle [Asp] / \triangle t$

v_n Geschwindigkeit der Hydroxylaminolyse, gemessen als $+ \triangle [AHM] / \triangle t$

Die Parameter K_m, K_i, und V_{max} der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung, auf deren Form die hier verwendeten Gleichungen gebracht sind, sind mit Indices versehen, die angeben auf welches Substrat (oder Produkt) und auf welche Teilreaktion sich die Größen beziehen. Hemmkonstanten sind zusätzlich durch den Index i gekennzeichnet.

Tabelle I: Bedeutung der kinetischen Parameter

Substrat	Reaktion	"K_m"	"V_{max}"
L-Asparagin (s)	Hydrolyse (h)	K_{sh}	V_{sh}

Tabelle I: (Forts.)

Substrat	Reaktion	"K_m"	"V_{max}"
L-Asp-hydroxamat (h)	Hydrolyse (h)	K_{hh}	V_{hh}
	Hydroxylaminolyse (t)	K_{st}	V_{st}
Hydroxylamin (n)	Hydroxylaminolyse (t)	K_{nt}	V_{nt}
Ammoniak (a)	AHM → Asn(tr)	K_{atr}	V_{atr}
Inhibitor	**Reaktion**	**"K_i"**	
Hydroxylamin	sh	K_{insh}	
Hydroxylamin	sh + st [a)]	K_{innh}	
Ammoniak	sh	K_{iash}	
Ammoniak	t	K_{iat}	

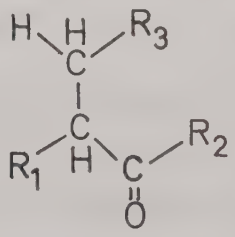
a) Gemeint ist die gleichzeitige Hydrolyse und Hydroxylaminolyse von Asparagin, gemessen als $v_n + v_w$.

III. KINETIK

3.1 Substratspezifität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir mit verbesserter Methodik einen Teil unserer früheren Experimente zur Substratspezifität [23] wiederholt und eine Reihe von weiteren möglichen Substraten der Asparaginase getestet. Das Ziel dieser Versuche war es, durch Abwandlung der funktionellen Gruppen des L-Asparagins Aufschlüsse über ihre Rolle im katalytischen Prozess zu erhalten.

Die untersuchten Verbindungen lassen sich alle durch die allgemeine Formel



darstellen. Der Rest R_1 ist dabei - mit einer Ausnahme - stets -NH-X, R_2 ist meist eine Hydroxylgruppe, während R_3 in der Mehrzahl der Fälle eine Acylfunktion -CO-X darstellt.

3.1.1 Methodik

Die Verbindungen wurden in einer Konzentration von 5-10 mM bei 37°C mit α-Ketoglutarat, NADH und GOT/MDH bzw. GDH nach 2.5.3.1 b zw. 2.5.3.2 inkubiert. Gestartet wurde mit etwa 1 U Asparaginase. Mit Substraten beobachtet man einen linearen Extinktionsabfall, dessen Geschwindigkeit der Enzymkonzentration proportional ist. Verbindungen, die unter diesen Bedingungen

keine signifikante Extinktionsänderung ergeben , sind in Tabelle II durch $V_{rel} = 0$ gekennzeichnet. Die Kinetik der Hydrolyse der Substrate wurde wie üblich nach 2.5.3 gemessen. Details findet man in den Legenden zu den Abbildungen 6 und 7.

3.1.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit Substratanalogen und die wichtigsten Literaturdaten sind in Tabelle II zusammengestellt. Neben den MICHAELIS-Konstanten K_m sind die relativen Maximalgeschwindigkeiten V_{rel} in % der Maxiamlgeschwindigkeit V_{sh} der Hydrolyse von L-Asparagin angegeben [+)]. Substrate sind mit S , Inhibitoren mit I gekennzeichnet.

a) Asparaginderivate mit abgewandelter Amidgruppe

Bei pH = 7,5 wird L-Asparaginsäure-ß-hydroxamat mit derselben Geschwindigkeit umgesetzt wie L-Asparagin. Die Konstante K_{hh} [+)] ist allerdings mit 0,76 mM etwa 70 mal höher als K_{sh}. Die pH-Abhängigkeit der Hydroxamathydrolyse ist in Abb. 7 dargestellt , sie ähnelt dem pH-Aktivitätsprofil des Enzyms mit Asparagin als Substrat.

L-Asparaginsäure-ß-hydrazid und L-Asparaginsäure-ß-methylamid werden dagegen erheblich langsamer umgesetzt (vgl. Abb. 6). Bei relativen Maximalgeschwindigkeiten von etwa 1 % liegen ihre K_m-Werte in derselben Größenordnung wie K_{sh} für Asparagin.

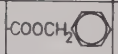
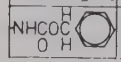
b) Estersubstrate

Die E. coli-Asparaginase katalysiert auch die Hydrolyse von L-Asparaginsäure-ß-methylester . Der Ester hat mit 14 mM das höchste K_{sh} der bisher bekannten Substrate . Bei pH 7 und 37° C beträgt die relative Aktivität etwa 13 %. Am pH-Optimum findet man die doppelte Aktivität, wegen der starken Spontanhydrolyse des Esters

---

[+)] Zur Definition der kinetischen Parameter vgl. Tab. I , S. 26 .

Tabelle II

R_1	R_2	R_3	Name		K_m [mM]	V_{rel} %	Lit.
$-NH_3^{\oplus}$	$-O^{\ominus}$	$-CO(NH_2)$	L-Asparagin	S	0,011 0,012 0,013 0,005	100	[12] [33] [24]
"	"	"	D-Asparagin	S I	0,28 ---- ----	5,5 7 6	[25] K_i=0,19mM [22] K_i/K_m=8
"	"	$-CO(NHOH)$	L-Asp-β-hydroxamat	S	0,76 3 ----	100 160 60	 [24] [25]
"	"	$-CO(NHCH_3)$	L-Asp-β-methyl amid	S	0,03	0,8	
"	"	$-CO(NHNH_2)$	L-Asp-β-hydrazid	S	0,04	0,6	
"	"		DL-Asp-β-p-nitroanilid	S	0,38	0,006	[28]
"	"	$-CH_2CO(NH_2)$	L-Glutamin	S I	6,25 5,9 2,7	2 6 2,6	[12] [25] [20]
"	"	"	D-Glutamin	S	----	0,1	[25]
"	"	$-C\equiv N$	β-Cyanoalanin	S	5,4	3,4	[20]
"	"	$-COCH_2(N_2)$	5-Diazo-4-oxonorvalin	S	0,01	1,9	[20]
"	"	$-CO(OCH_3)$	L-Asp-β-methyl ester	S	14 ----	13 0,3	 [25]
"	"		L-Asp-β-benzyl ester			0	
$-\overset{\oplus}{N}H_2C_2H_5$	"	$-CO(NH_2)$	DL-N^{α}-Äthyl asparagin	S I	0,20	2,5	K_i/K_m= 6,5
$-Cl$	"	"	DL-α-Chlor-bernsteinsäure-β-amid			0	$K_i \gg K_m$
$-NHCOCH_2Cl$	"	"	L-N^{α}-Chloracetyl-asparagin			0	$K_i \gg K_m$
$-NHCOCH_2\overset{\oplus}{N}H_3$	"	"	Glycyl-L-asparagin			0	
	"	"	CBO-L-Asparagin	I		0	K_i/K_m= 5,5

R_1	R_2	R_3	Name		K_m[mM]	V_{rel} %	Lit.
$-NH_3^{\oplus}$	$-NH_2$	$-CO(NH_2)$	L-Asp-diamid	I		0	$K_i/K_m = 18$
"	$-OCH_3$	$-CO(OCH_3)$	L-Asp-dimethyl-ester			0	
"	$-NH\,CH_2COO^{\ominus}$	$-CO(NH_2)$	L-Asn-Gly			0	
"	$-NH_2$	$-COO^{\ominus}$	L-Isoasparagin			0	$K_i \gg K_m$
"	$-O^{\ominus}$	$-NH_3^{\oplus}$	L-α,β-Diamino-propionsäure				$K_i \gg K_m$
"	"	$-CH_2NH_3^{\oplus}$	L-α,γ-Diamino-buttersäure				$K_i \gg K_m$
$-\overset{H}{N}$-CBO	"	$-SCH_2$⬡	CBO-S-Benzyl-L-cystein	I			$K_i \gg K_m$
"	"	$-COO^{\ominus}$	CBO-L-Asparagin-säure	I			$K_i/K_{m(AHM)} = 5$
$-NH_3^{\oplus}$	"	"	L-Asparaginsäure	I			[25] $K_i = 2{,}3$ mM
			Glycin	I			$K_i/K_{m(AHM)} = 50$

Tabelle II Substrate und Inhibitoren der E. coli- Asparaginase. Erläuterungen im Text.

---

ist es jedoch schwierig, die Aktivität bei diesen pH - Werten mit ausreichender Genauigkeit zu bestimmen.

L- Asparaginsäure - ß - äthylester ist bereits ein sehr schlechtes Substrat, der ß - Benzylester wird gar nicht mehr umgesetzt.

c) Derivate mit abgewandelter α - Aminogruppe

Von den untersuchten Substratanalogen dieses Typs wird lediglich DL - N^{α} - Äthylasparagin umgesetzt. Dabei werden nur 50 % der Einwaage - die L - Form des Substrats - hydrolysiert. Die ungewöhnliche pH - Abhängigkeit der Reaktion (vgl. Abb. 7) geht wahrscheinlich auf die Hemmung der Hydrolyse der L - Verbindung durch die D - Form zurück. Für die DL - Verbindung finden wir ein K_{sh} von 0,20 mM und eine relative Maximalgeschwindigkeit von 2,5 %. (siehe Abb. 6).

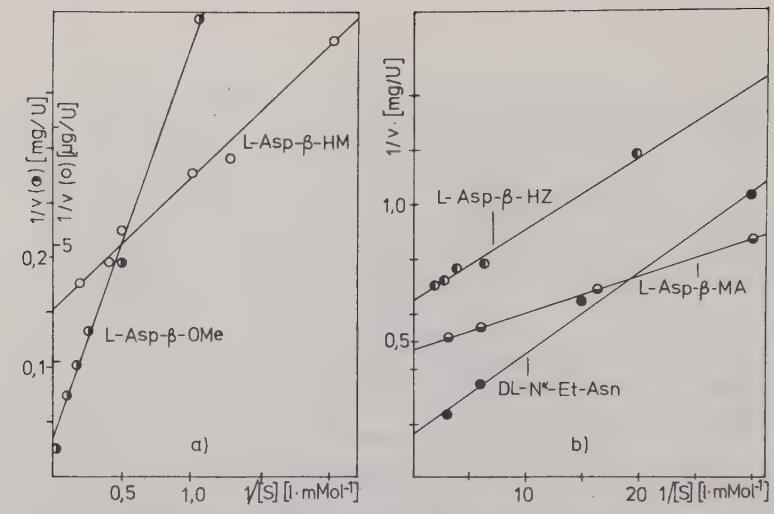


Abb. 6 LINEWEAVER-BURK-Diagramme für die Hydrolyse von L-Asparaginsäure-ß-hydroxamat (O), L-Asparaginsäure-ß-methylester (◑), L-Asparaginsäure-ß-methylamid (◒), L-Asparaginsäure-ß-hydrazid (◐) und DL-N^{α}-Äthylasparagin (●)

Die Messungen wurde bei 37°C wie folgt durchgeführt

Substrat	Puffer, pH	Methode
L-Asp-ß-hydroxamat	0,05 M TEA; 7,5	2.5.3.3
L-Asp-ß-methylester	0,1 N NaCl; 7,0	2.5.3.7
L-Asp-ß-methylamid	0,05 M TRIS; 7,5	2.5.3.1 b)
L-Asp-ß-hydrazid	0,05 M TRIS; 7,5	2.5.3.6
DL-N^{α}-Äthylasparagin	0,1 M TRIS; 8,0	2.5.3.2 b)

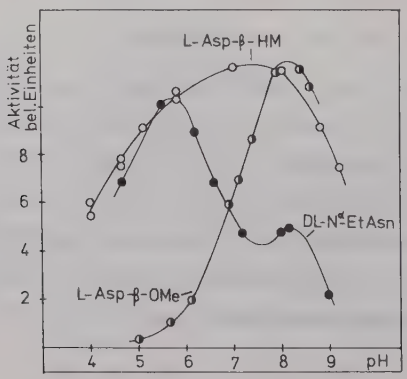


Abb. 7

Abb. 7 pH - Abhängigkeit der Hydrolyse einiger Substrate durch Asparaginase. Dargestellt sind Werte für L - Asp - ß - hydroxamat 5mM (O), L - Asp - ß - methylester, 100 mM (◑) und DL - N - Äthyl - asparagin, 2 mM (●).

Keine Aktivität fanden wir mit DL - α Chlorsuccinamid, L - N^{α} - Chlor - acetylasparagin, Glycyl - L - asparagin und CBO - L - Asparagin.

3. 2 KOMPETITIVE INHIBITOREN

3. 2. 1 Methodik

Die Testansätze enthielten im allgemeinen die zu untersuchende Verbindung in einer Konzentration von 40 mM und L - Asparagin in Konzentrationen zwischen 2 und 10 mM in 0, 05 M Triäthanolaminpuffer, pH = 7, 6 , Sie wurden zusammen mit Kontrollansätzen ohne Inhibitor bei 37°C inkubiert. Die Hydrolysegeschwindigkeiten v und v_i wurden nach 2. 5. 3. 1 a) bestimmt.

3. 2. 2 Ergebnisse (vgl. Tabelle II)

Alle Substrate des Enzyms, deren Inhibitoreigenschaften wir untersucht haben, hemmen erwartungsgemäß die Hydrolyse von L - Asparagin kompetitiv.

Außerdem hemmen L - Asparaginsäurediamid und CBO - L - Asparagin die beide nicht desamidiert werden, ebenfalls kompetitiv. Mit Asp - ß - hydroxamat als Substrat finden wir in Veronalpuffer, pH = 9, 0, kompetitive Hemmung durch CBO - L - Asparaginsäure und Glycin.

Die aus Diagrammen nach HUNTER und DOWNS (siehe Abb. 8) ermittelten Quotienten $K_{i(Inh.)}/K_{sh(Substr.)}$ sind in der letzten Spalte der Tabelle II aufgeführt. Die aus ihnen berechneten K_i - Werte stimmen im allgemeinen nicht mit den kinetisch ermittelten MICHAELIS - Konstanten K_{sh} für die Hydrolyse dieser Verbindungen überein. Dies ist auch nicht zu erwarten, da die K_{sh} nicht mit den Bindungskonstanten K_s identisch sind. (vgl. III, S. 8)

Man kann abschätzen, daß unter den in 3. 2. 1 beschriebenen Bedingungen

ein Inhibitor nur dann als solcher erkannt werden kann, wenn K_i/K_m einen Wert von etwa 200 nicht übersteigt. Für höhere K_i liegt $v-v_i$ innerhalb der Fehlerbreite bei der Bestimmung von v_w. Verbindungen die in unseren Experimenten keine signifikante Hemmung der Hydrolyse von Asparagin hervorgerufen haben, sind in Tabelle II durch $K_i \gg K_m$ gekennzeichnet. Dazu gehören DL-α-Chlorsuccinamid, L-Isoasparagin, L-N^{α}-Chloracetylasparagin, L-α,ß-Diaminopropionsäure, L-α,γ-Diaminobuttersäure und CBO-S-Benzyl-L-Cystein. Die HUNTER-DOWNS-Diagramme für einige Inhibitoren sind in Abb. 8 dargestellt.

3.3 NICHT KOMPETITIVE INHIBITOREN

3.3.1 Hemmung der Asparaginhydrolyse durch Ammoniak

Ammoniak - das erste Produkt der Reaktion - hemmt die Hydrolyse von L-Asparagin durch Asparaginase. Die LINEWEAVER-BURK-Geraden der gehemmten und der ungehemmten Reaktion sind in Abb. 9 dargestellt; sie verlaufen annähernd parallel zueinander.

Auch dieser Befund steht in Einklang mit Mechanismus I. Aus den Gleichungen III und IV (siehe S. 8/9) ergibt sich bei hohen Substratkonzentrationen

$$\text{(XII)}\quad v_w = \frac{k_2 k_w [E]_0}{k_2 + k_w + k_{-2}[A]} = V_{iash}$$

Die Maximalgeschwindigkeit V_{sh} nimmt mit steigender Ammoniakkonzentration ab, die Hemmkonstante K_{iash} ist definiert durch

$$\text{(XIII)}\quad V_{iash} = V_{sh}/[1 + ([A]/K_{iash})\,];\ K_{iash} = (k_2 + k_w)/k_{-2}$$

Wir haben V_{iash} und V_{sh} in 0,05 M Triäthanolaminpuffern von pH 7,5 und 8,0 sowie in 0,05 M BICIN-Puffer, pH = 8,4, bestimmt. Setzt man für [A] die Konzentration der freien Base NH_3 in XIII ein, ergibt sich

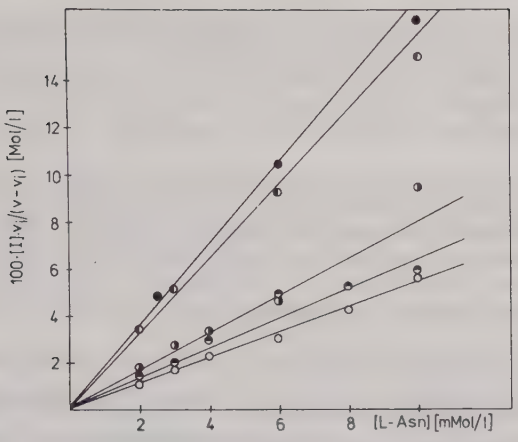


Abb. 8

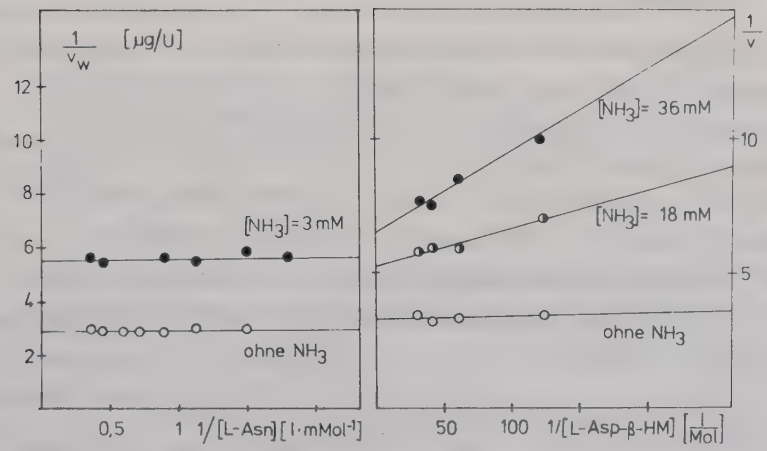


Abb. 9

Abb. 10

Abb. 8 Kompetitive Inhibitoren der Asparaginhydrolyse. Diagramme nach HUNTER und DOWNS für L-Asp-diamid (●), L-Glutamin (◐), D-Asparagin (◑), DL-N^{α}-Äthylasparagin (◓) und CBO-L-Asparagin (○). Vgl. 3.2.2.

Abb. 9 Hemmung der Hydrolyse von L-Asparagin durch Ammoniak. Die Ansätze enthielten in 0,05 M BICIN-Puffer, pH = 8,4, Asparagin in wechselnden Mengen und 22 mM NaCl (○) bzw. 22 mM NH_4Cl (●). Inkubation bei 37°C mit 0,5 U Enzym. v_w wurde nach 2.5.3.1 a) bestimmt. Diagramm nach LINEWEAVER und BURK.

Abb. 10 Hemmung der Hydrolyse von L-Asp-ß-hydroxamat durch Ammoniak. Die Ansätze enthielten in 0,1 M Veronalpuffer, pH = 9, Substrat in wechselnder Konzentration sowie 100 mM NaCl (○) oder 100 mM NH_4Cl (●) bzw. 50 mM NH_4Cl und 50 mM NaCl (◑). Inkubation bei 37°C mit 0,5 U Enzym. Das freigesetzte Hydroxylamin wurde nach 2.5.3.3 bestimmt. Diagramm nach LINEWEAVER und BURK.

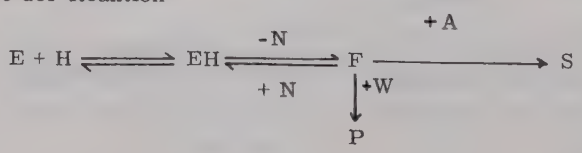
---

für K_{iash} ein pH- unabhängiger Wert von $4 \pm 0,5$ mM. Ähnliche Ergebnisse haben CAMPBELL und MASHBURN erhalten [22]. Aus den Daten dieser Autoren haben wir für K_{iash} einen Wert von 4,5 mM berechnet.

3.3.2 Hemmung der Hydrolyse von L-Asp-ß-hydroxamat durch Ammoniak

Wird Asp-ß-hydroxamat ebenfalls nach Mechanismus I umgesetzt, läßt sich die Hydrolyse dieses Substrats und ihre Hemmung durch Ammoniak nach Gleichung VI, S. 9, beschreiben, wenn man N durch A, S durch H und v_n durch v_{tr} ersetzt. Danach sollte NH_3 die Reaktion gemessen als $-d[H]/dt$ ebenfalls unkompetitiv hemmen. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, trifft dies jedoch nicht zu.

Die beobachtete Hemmung folgt keinem der einfachen Hemmtypen. Man kann sie durch die Annahme interpretieren, daß Ammoniak im Laufe der Reaktion



nicht nur unter Bildung von S (= Asparagin) am Zwischenprodukt F angreift, sondern auch mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum konkurriert. Mit Asparagin als Substrat macht sich dieser "kompetitive Anteil " der Hemmung wegen des viel höheren Quotienten K_{sh}/K_{ia} kaum bemerkbar. Für eine eingehende Interpretation der Produkthemmung durch Ammoniak reichen die vorliegenden Daten noch nicht aus.

3.4 ENZYMATISCHE SYNTHESE VON L-ASPARAGIN AUS L-ASP-ß-HYDROXAMAT

Wenn die Hydrolyse von Asparagin und Asp-ß-hydroxamat über dasselbe Zwischenprodukt F verläuft, sollte es möglich sein, in Gegenwart von Ammoniak enzymatische Synthese von L-Asparagin aus dem Hydroxamat nachzuweisen.

Um ausreichende Asparaginkonzentrationen im steady-state aufrechtzuerhalten, müssen das Hydroxamat und Ammoniak (als freie Base) in möglichst hoher Konzentration vorgelegt werden, da NH_3 mit Wasser und Hydroxylamin um die Species F konkurriert und Asp-ß-hydroxamat die enzymatische Hydrolyse des gebildeten Asparagins nur dann effektiv hemmt, wenn es in hohem Überschuß vorliegt. ($K_{hh}/K_{sh} \approx 70$) Außerdem muß man die Reaktion abbrechen, bevor sich größere Mengen Hydroxylamin angesammelt haben, da dies die Reaktion hemmt (vgl. [23]).

3.4.1 Methodik

Da sich Asparagin neben Ammoniak und Asparaginsäure in großen Überschüssen mit unseren Methoden nicht quantitativ bestimmen läßt, haben wir die Reaktionsprodukte vor der Analyse durch Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt.

a) Inkubation: Im Reaktionsgefäß des pH-Staten wurden 90 mg Asp-ß-hydroxamat (= 0,6 mMol) bei 2°C in 0,75 ml Wasser gelöst und die

Lösung mit 0,25 ml 3 N NaOH auf pH 9,2 gebracht. Dann wurden 2,0 ml eines NH_4OH/NH_4Cl-Puffers von pH 9,2 zugesetzt und der Ansatz nach Temperieren auf 37°C mit 100 U Asparaginase genau 5 min lang inkubiert, wobei der pH-Wert durch automatische Titration mit starker NaOH konstant gehalten wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 5 N Perchlorsäure beendet, mit 5 N KOH wurde dann ein pH-Wert von 5,3 eingestellt und die Lösung nach Abtrennung des ausgefallenen $KClO_4$ und des denaturierten Proteins auf 5 ml aufgefüllt. Für jede NH_3-Konzentration wurde ein Kontrollansatz mitgeführt, der kein Enzym enthielt, sonst jedoch genauso behandelt wurde wie die Proben.

b) Auftrennung der Reaktionsprodukte: 1,5 ml der enteiweißten Lösung wurden auf eine Austauschersäule (1 x 20 cm, DOWEX 50 x 8, 200 - 400 mesh), äqulibriert mit M/15 SOERENSEN - Phosphatpuffer, pH = 5,3, aufgetragen. Eluiert wurde mit demselben Puffer mit einer Geschwindigkeit von 15 ml/h. Unter diesen Bedingungen verbleibt $NH_4^{\oplus}$ quantitativ auf der Säule, während Asparaginsäure von Asparagin und Asp - ß - hydroxamat, die gemeinsam eluiert werden, abgetrennt wird. Das Erscheinen der Aminosäuren im Eluat wurde durch Tüpfeln auf Filterpapier und Besprühen mit Ninhydrin bzw. $FeCl_3$ verfolgt.

c) Analyse: Im Eluat wurde Asparaginsäure nach 2.5.3.1 und Asp - ß - hydroxamat nach 2.5.3.5 bestimmt. Zur Bestimmung von Asparagin wurde ein geeignetes Aliquot zunächst nach 2.5.3.2 mit α-Ketoglutarat, NADH und GDH inkubiert. Die dabei auftretende Abnahme der Extinktion stammt von den in Reagenzien und Probelösung enthaltenen Ammoniakspuren. Dann wurde $NH_4^{\oplus}$- freie Asparaginase zugesetzt, die erneute Extinktinktionsänderung ist ein Maß für den Asparagin - Gehalt der Lösung.

3.4.2 Ergebnisse

In allen Ansätzen ließ sich enzymatische Synthese von Asparagin

nachweisen, nicht jedoch in den Kontrollen ohne Enzym. Die Ergebnisse eines der Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

$[NH_3]$ mM	µMol AHM/5 min[a)]	µMol Asp/5 min[b)]	µMol Asn/5 min[c)]
102	94	80	13
44	115	105	7
22	120	109	5

a) µMol Asp-ß-hydroxamat, verschwunden während der Inkubation nach 3.4.1 a) .

b) µMol Asparaginsäure, gebildet im gesamten Ansatz

c) µMol Asparagin, im gesamten Ansatz entstanden .

Aus der Hemmung der Hydroxamathydrolyse wurde der Parameter K_{iahh} und aus der Abhängigkeit der Asparaginbildung von der NH_3-Konzentration die MICHAELIS-Konstante K_{atr} berechnet. Aus drei Experimenten ergaben sich die folgenden Mittelwerte.

$$K_{iahh} = 0,15 \pm 0,05 \quad \text{Mol/l}$$
$$K_{atr} = 0,2 \pm 0,05 \quad \text{Mol/l}$$

für einen pH-Wert von 9,2 .

3.5 KINETIK DER ENZYMATISCHEN HYDROXYLAMINOLYSE VON L-ASPARAGIN

3.5.1 Methodik

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion wurden, wenn nicht anders angegeben, in MES- oder MOPS-Puffer nach der Molybdatmethode (siehe 2.5.3.4) bestimmt. Details sind in den Legenden zu den Abb. 11 bis 16 angegeben.

3.5.2 Ergebnisse

3.5.2.1 Die Kinetik der enzymatischen Synthese von L-Asparagin-

säure - ß - hydroxamat bei pH 7,0 in einem weiten Bereich von Substratkonzentrationen zeigt die Abb.11. Unter den Bedingungen dieses Experiments beträgt die relative Aktivität bei einer Hydroxylaminkonzentration von 0,33 M etwa 25 % (bezogen auf V_{sh} in Abwesenheit von Hydroxylamin). Dieser Wert stimmt mit Angaben von NAKAMURA et al. [25] überein, dagegen finden EHRMAN et al. [24] einen etwa viermal so hohen Wert.

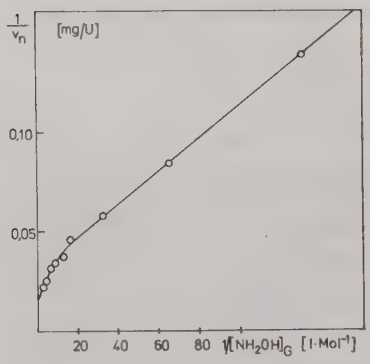


Abb. 11

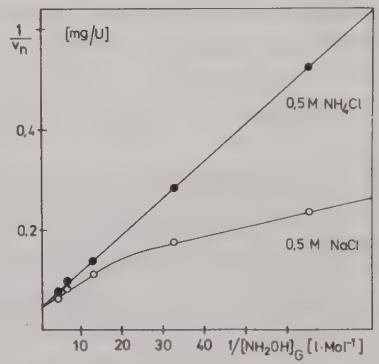


Abb. 12

Abb. 11 Kinetik der durch Asparaginase katalysierten Hydroxylaminolyse von L - Asparagin. v_n wurde in MOPS - Puffer, pH = 7,0, bei 37°C nach 2.5.3.4 bestimmt. Diagramm nach LINEWEAVER und BURK.

Abb. 12 Hemmung der enzymatischen Hydroxylaminolyse von L - Asparagin durch Ammoniak. Bestimmung der v_n in BICIN - Puffer, pH = 7,8, bei 37°C nach 2.5.3.4. Die Ansätze enthielten dabei zusätzlich 0,5 M NaCl(O) bzw. 0,5 M NH_4Cl (●). Diagramm nach LINEWEAVER und BURK.

Bei hohen Hydroxylaminkonzentrationen treten im LINEWEAVER - BURK-Diagramm Abweichungen von der Linearität auf. Die Kinetik der Reaktion im pH - Bereich zwischen 5,5 und 7,5 ist in den Abb. 13 und 14 dargestellt.

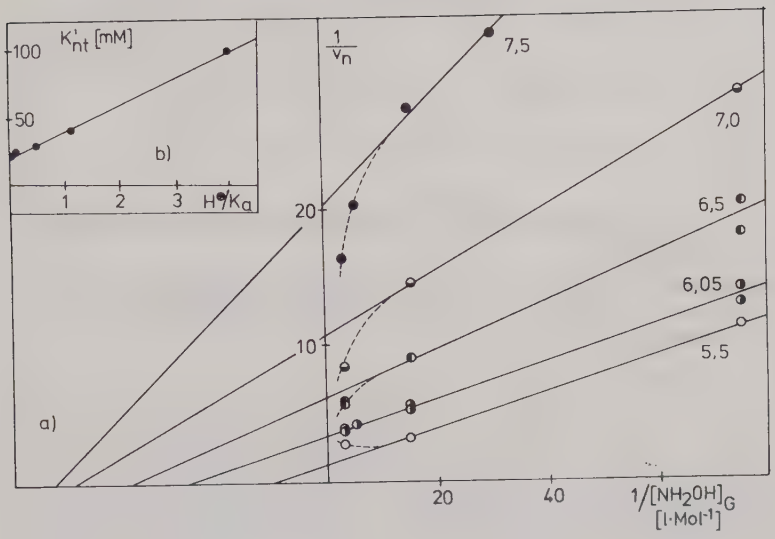

K'_{nt} [mM]
100
50
b)
1
2
3
$H^{\oplus}/K_a$
$\frac{1}{v_n}$
7,5
7,0
6,5
6,05
5,5
20
10
a)
20
40
$1/[NH_2OH]_G$
$[l \cdot Mol^{-1}]$

Abb. 13

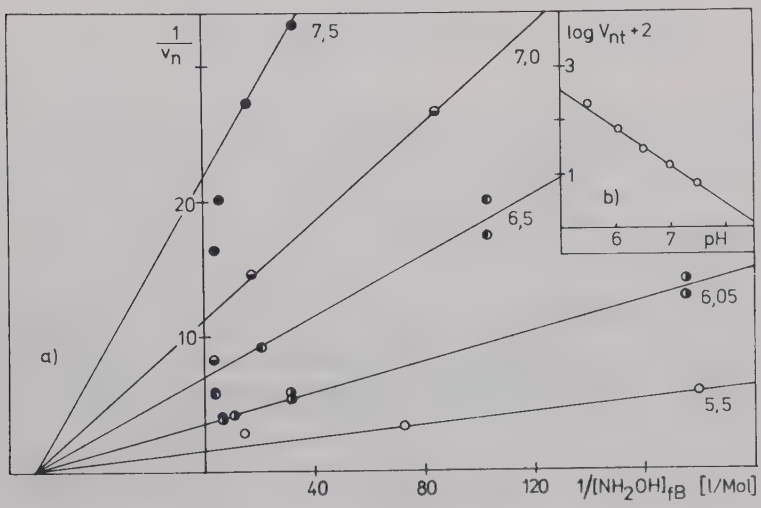

$\frac{1}{v_n}$
7,5
7,0
6,5
6,05
5,5
20
10
a)
log V_{nt} + 2
3
1
b)
6
7
pH
40
80
120
$1/[NH_2OH]_{fB}$ [l/Mol]

Abb. 14

Abb. 13 pH - Abhängigkeit der enzymatischen Hydroxylaminolyse von L - Asparagin. Die Geschwindigkeiten v_n wurden bei 25°C nach 2. 5. 3. 4 bestimmt. Puffer: MES , pH 5, 5 bis 6, 5 ; MOPS , pH 6, 5 bis 7, 5.

a) Diagramm nach LINEWEAVER und BURK. $[NH_2OH]_G = [NH_2OH]_{fB} + [NH_3OH^{\oplus}]$ als Substratkonzentration.

b) Abhängigkeit der graphisch ermittelten K_{nt} von $[H^{\oplus}] / K_a$, vgl. 3. 5. 4 .

Abb. 14 pH - Abhängigkeit der enzymatischen Hydroxylaminolyse von L - Asparagin.

a) Diagramm nach LINEWEAVER und BURK. Aufgetragen sind die reziproken v_n aus Abb. 13 gegen $1 / [NH_2OH]_{fB}$ als reziproke Substratkonzentration.

b) pH - Abhängigkeit von $\log V_{nt}$.

Dabei sind in Abb. 13 die Gesamtkonzentrationen $[NH_2OH]_G$, in Abb. 14 dagegen die Konzentrationen der freien Base des Hydroxylamins $[NH_2OH]_{fB}$ als Substratkonzentrationen eingesetzt. Im ersten Fall sind die durch Extrapolation gewonnenen MICHAELIS - Konstanten K_{nt} und die Maximalgeschwindigkeiten V_{nt} vom pH - Wert abhängig, während im zweiten Fall K_{nt} im gesamten pH- Bereich konstant ist.

3. 5. 2. 2 Die pH-Abhängigkeit von v_n geht ebenfalls aus Abb. 16 hervor. Sie ist charakterisiert durch ein Maximum zwischen pH 5, 5 und 6, 0 und weist somit keine Ähnlichkeit mit den pH - Aktivitätsprofilen für die hydrolytischen Aktivitäten der Asparaginase auf.

3. 5. 2. 3 Ammoniak hemmt die Hydroxylaminolyse von Asparagin kompetitiv zum Substrat Hydroxylamin (siehe Abb. 12). Die Hemmkonstante K_{iat} hat - bezogen auf die freie Base NH_3 - einen Wert von etwa 4 mM.

3. 5. 2. 4 Dagegen aktiviert Imidazol die Reaktion. Die Abhängig-

keit dieses Effektes von der Imidazolkonzentration bei pH = 6,5 und 7,5 ist aus Abb. 15 zu entnehmen. Der Extinktionskoeffizient des Hydroxamat-Molybdat-Komplexes bei 319 nm wird durch Imidazol nicht beeinflußt.

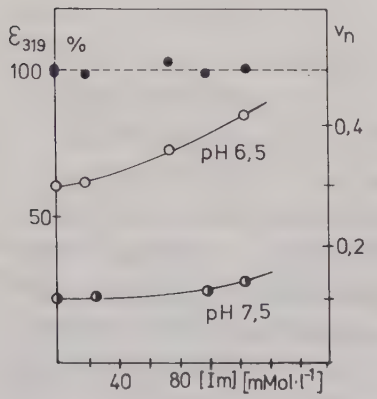


Abb. 15

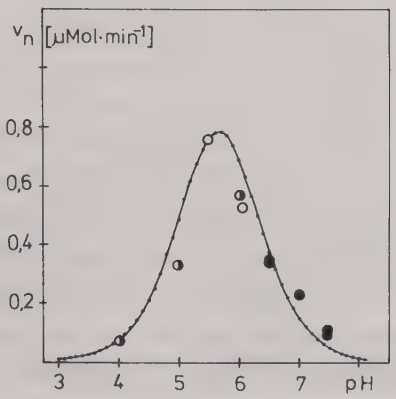


Abb. 16

Abb. 15 Aktivierung der Hydroxylaminolyse von L-Asparagin durch Imidazol. Die Geschwindigkeiten v_n wurden in MES-Puffer, pH = 6,5 (◑) bzw. MOPS-Puffer, pH = 7,5, (○) nach 2.5.3.4 bestimmt, wobei den Ansätzen Imidazol in wechselnden Konzentrationen zugesetzt wurde. Durch Zugabe von Asp-ß-hydroxamat in definierten Mengen wurden die Extinktionskoeffizienten in jedem Ansatz überprüft. Sie sind in % des Mittelwertes aller Bestimmungen ebenfalls gegen die Imidazolkonzentration aufgetragen (●).

Abb. 16 pH-Abhängigkeit der enzymatischen Hydroxylaminolyse von L-Asparagin. Bestimmung von v_n bei 25°C mit $[NH_2OH]_G$ = 0,1 M und 4,2 U Asparaginase nach 2.5.3.4 in a) MOPS-Puffer (●) b) MES-Puffer (○) und c) in Citrat-Puffer (◑) nach folgender Methode: Ansätze von 1,0 ml wurden 5 min mit Enzym inkubiert, dann mit 2 ml Eisenchlorid-Reagenz (siehe 2.5.3.5) versetzt und v_n aus der Extinktion bei 510 nm bestimmt. Die Kurve ⋯⋯ ist aus Gleichung XVI berechnet, vgl. dazu 3.3.4.2 .

3.5.3 NICHTENZYMATISCHE HYDROXYLAMINOLYSE VON MODELLVERBINDUNGEN

Durch Untersuchungen von JENCKS ist bekannt, daß bei der Umsetzung von reaktiven Acylverbindungen R - CO - X mit Hydroxylamin neben den Hydroxamsäuren R - CO - NHOH auch die O-Acylderivate R - CO - ONH_2 entstehen, die mit überschüssigem Hydroxylamin in einer langsameren Folgereaktion zu den Hydroxamaten weiterreagieren können [64, 65]. Man beobachtet schnelle und quantitative Freisetzung von X durch Hydroxylamin, wobei jedoch zunächst nur ein Bruchteil der theoretischen Menge Hydroxamsäure entsteht. (z.B. 25 % aus p-Nitrophenylacetat, 49 % aus Acetanhydrid und 96 % aus Benzoylchlorid). Die Geschwindigkeit der Umwandlung von O-Acetylhydroxylamin in Acethydroxamsäure durch NH_2OH ist um drei Größenordnungen kleiner als die der Freisetzung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenylacetat durch Hydroxylamin in derselben Konzentration [65].

Wir haben in ähnlicher Weise die nichtenzymatische Hydroxylaminolyse von CBO-L-Isoasparagin-p-nitrophenylester (ZPNIA) und Phthalsäureanhydrid untersucht, die man als Modellverbindungen für zwei denkbare Formen eines Zwischenprodukts F in Mechanismus I betrachten kann: ZPNIA ist der reaktive ß-Ester eines Asparaginsäurederivates mit geschützten α- Amino- und α- Carboxylgruppen, Phthalsäureanhydrid weist als cyclisches Säureanhydrid etwa dieselbe Ringgröße auf, wie das innere Anhydrid der Asparaginsäure.

3.5.3.1 Methodik

ZPNIA wurde aus CBO - L - Isoasparagin synthetisiert (siehe 2.3.2). Phthalsäureanhydrid wurde aus siedendem Essigsäureanhydrid umkristallisiert. Die Spaltung der Esterbindung von ZPNIA läßt sich spektralphotometrisch an der Extinktionsabnahme bei 275 nm, die des

Phthalsäureanhydrids bei 300 nm verfolgen. Die gebildeten Hydroxamsäuren wurden nach 2. 5. 3. 5 mit Eisen(III)-Chlorid bestimmt.

Bei 25°C wurden 4 ml NH_2OH / NH_3OHCl - Puffer (0,5 M) mit 15 µMol ZPNIA in 1 ml Acetonitril gemischt. Während der Inkubation wurden Proben von 1 ml entnommen und mit 2 ml $FeCl_3$ - Reagenz versetzt. Dann wurden sofort die Extinktionen bei 550 nm gegen einen Blindwert aus 1 ml 0,4 M NH_2OH und 2 ml Reagenz gemessen. Die Geschwindigkeitskonstanten der Esterspaltung wurden wie üblich aus halblogarithmischen Diagrammen von $(E_t - E_\infty)_{275}$ gegen t, die der Hydroxamatbildung aus den Anfangssteigungen der Abb.18 ermittelt. Wir haben dabei den Extinktionskoeffizienten des Eisen(III)-Komplexes von Asp-ß-hydroxamat zugrundegelegt. Die Hydroxamatbildung aus CBO-L-Isoasparagin ist unter den Bedingungen des Experiments zu vernachlässigen.

Zur Bestimmung der Hydroxamsäurebildung aus Phthalsäureanhydrid vgl. die Legende zu Abb. 17 .

3. 5. 3. 2 Ergebnisse

Für die Hydroxylaminolyse von ZPNIA - gemessen als $-d[ZPNIA]/dt$ - ergab sich bei pH = 6,0 eine Geschwindigkeitskonstante von 55 $l \cdot Mol^{-1} \cdot min^{-1}$, bei pH = 6,5 ein Wert von 90 $l \cdot Mol^{-1} \cdot min^{-1}$. Dabei entstehen 20 - 30 % Hydroxamsäure. Die Geschwindigkeitskonstanten für die langsame Folgereaktion (siehe Abb. 18) liegen zwischen pH 5 und 7 in der Größenordnung von 0,05 $l \cdot Mol^{-1} min^{-1}$ mit einem Maximum zwischen pH 6 und 6,5. Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit den Befunden von JENCKS an p-Nitrophenylacetat überein [65].

Die Ergebnisse eines Experiments mit Phthalsäureanhydrid sind in Abb. 17 dargestellt. Die Geschwindigkeit der Spaltung des Anhydrids läßt sich unter den gewählten Bedingungen mit gewöhnlichen Mitteln nicht mehr messen. Man erhält dabei etwa 65 % Hydroxamat. Die Geschwindigkeitskonstante der Folgereaktion liegt bei 5 $l \cdot Mol^{-1} \cdot min^{-1}$.

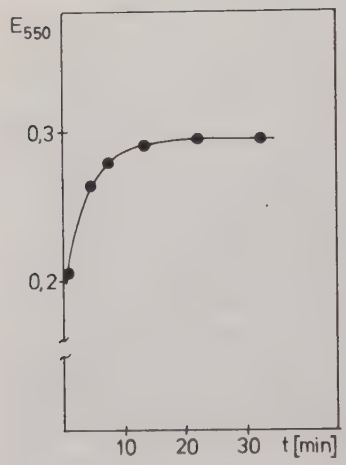


Abb. 17

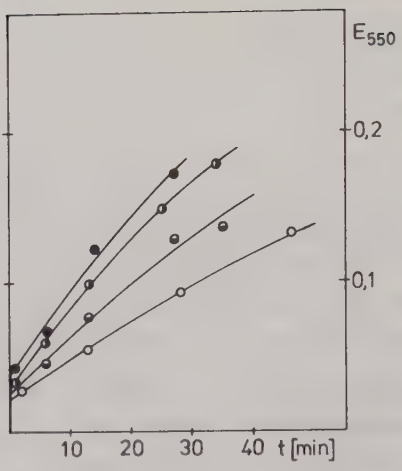


Abb. 18

Abb. 17 Nichtenzymatische Hydroxylaminolyse von Phthalsäureanhydrid. In McILVAINE-Puffer, pH = 6,0 ,(10 Vol.-% Äthanol, 0,5 M an NaCl) wurde Phthalsäureanhydrid (3 mM) mit Hydroxylamin (50 mM) bei 37°C inkubiert. Proben von 1 ml wurden mit 2 ml $FeCl_3$-Reagenz versetzt. Aufgetragen sind die Extinktionen dieser Lösungen bei 510 nm gegen die Inkubationsdauer.

Abb. 18 Nichtenzymatische Hydroxylaminolyse von ZPNIA . Aufgetragen sind als Maß für die Menge des gebildeten Hydroxamats die nach 3.5.3.1 ermittelten Extinktionen bei 550 nm gegen die Inkubationszeit für verschiedene pH-Werte : pH 5,4 (○) , pH 5,7 (◒) , pH 6,3 (◑) und pH 6,8 (●) .

3.5.4 Diskussion

Zur Interpretation der Kinetik der enzymatischen Reaktion betrachten wir zunächst nur Größen,die durch Extrapolation von Werten bei niedrigen Substratkonzentrationen ermittelt wurden. Mögliche Ursachen für die Abweichungen von der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik bei hohen Hydroxylaminkonzentrationen werden in Abschnitt 3.5.4.4 diskutiert.

3.5.4.1 Wenn man annimmt, daß die freie Base NH_2OH die reaktive Species darstellt, wird aus Gleichung VII, S. 10, die pH-Abhängigkeit von K_{nt} verständlich, die man mit NH_2OH_G als Substrat beobachtet. Setzt man nämlich in Gleichung VII

$$[N]_{fB} = [N]_G \cdot \frac{K_a}{K_a + [H^{\oplus}]}$$

ein, wobei K_a die Dissoziationskonstante des Hydroxylammonium-Ions ist ($pK_a = 6,08$ bei 25^oC nach [37]), erhält man

$$(XIV) \quad v_n = \frac{k_2[E]_o \cdot [N]_G}{[N]_G + K_{nt}(1 + ([H^{\oplus}] / K_a)}$$

Der experimentell gefundene Parameter K_{nt} sollte danach linear mit $[H^{\oplus}] / K_a$ zunehmen. Wie Abb. 13 b) zeigt, trifft dies zu. Die pH-unabhängige Konstante K_{nt} ergibt sich daraus als

$$(XV) \quad K_{nt} = (k_2 + k_w) / k_n = 17 \text{ mM}$$

Trägt man die reziproken v_n also gegen $1 / [N]_{fB}$ auf (siehe Abb. 14), schneiden sich die extrapolierten Geraden auf der Abszisse bei $-1 / K_{nt}$.

3.5.4.2 Dagegen läßt sich die pH-Abhängigkeit von V_{nt} aus diesem Ansatz nicht ableiten. Gleichartige Profile sind für die pH-Abhängigkeit der Hydroxamatsynthese aus Asparagin durch ein Enzym aus Proteus vulgaris [34] bzw. aus Glutamin durch eine Glutaminase aus E. coli [35] und einen Extrakt von M. phlei [66] beschrieben worden. Dagegen nimmt die Geschwindigkeit der Hydroxylaminolyse von Asparagin durch ein zellfreies System aus Ps. fluorescens zwischen pH 8 und 5 monoton ab, wobei ein Wendepunkt bei pH 6 zu bestehen scheint [67]. Eine ähnliche pH-Abhängigkeit findet man für die Hydroxylaminolyse von Hippursäuremethylester durch α-Chymo-

trypsin [37]. Die beiden letztgenannten Fälle lassen sich qualitativ durch Gleichung XIV beschreiben.

Bei der Asparaginase aus E. coli ist log V_{nt} zwischen pH 6 und pH 8 eine lineare Funktion des pH-Wertes (vgl. Abb. 14 b). Man kann daher annehmen, daß dieser Aktivitätsabfall auf die Dissoziation einer funktionellen Gruppe des Enyzms zurückgeht, die für die Transferaseaktivität essentiell ist und eine Dissoziationskonstante K_e von ungefähr 10^{-6} aufweist. Dann wird XIV zu

$$(XVI) \qquad v_n = \frac{\dfrac{k_2[E]_o}{\left[1 + \dfrac{K_e}{[H^{\oplus}]}\right]}[N]_G}{[N]_G + K_{nt}\left[1 + \dfrac{[H^{\oplus}]}{K_a}\right]}$$

Die durchgezogene Linie in Abb. 16 ist aus dieser Gleichung berechnet, wobei $K_e = 1 \cdot 10^{-6}$ M , $K_a = 8 \cdot 10^{-7}$ M , $[N]_G = 0,1$ M und $K_{nt} = 0,02$ M eingesetzt wurde. Die Größe $k_2[E]_o$ wurde so gewählt, daß der Ordinatenmaßstab der berechneten Kurve mit dem für die Meßpunkte zusammenfiel.

Als funktionelle Gruppe der erwähnten Art käme der protonierte Imidazolring eines Histidinrestes in Frage. Unser Befund, daß sich die enzymatische Synthese von Asp-ß-hydroxamat durch Imidazol aktivieren läßt (siehe 3. 5. 2. 4) weist ebenfalls auf eine solche Möglichkeit hin.

3. 5. 4. 3 Die kompetitive Hemmung der Hydroxylaminolyse von Asparagin durch Ammoniak steht mit Mechanismus I völlig in Einklang. Aus Gleichung VII , S. 10 , geht hervor, daß die Zunahme der Ammoniakkonzentration [A] den Wert der Konstanten K_{nt} erhöhen, den Parameter V_{nt} jedoch nicht beeinflussen sollte. Mit

$$K_{iat} = K_{nt} / (K_{nt(A)} - K_{nt})$$

ergibt sich die Bedeutung der Hemmkonstanten K_{iat} als

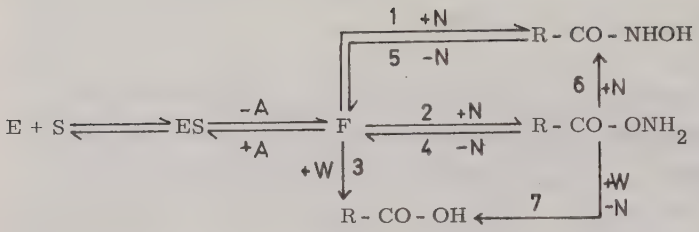
$$K_{iat} = (k_2 + k_w) / k_{-2}$$

Ebenso definiert ist K_{iash}, die Konstante für die Hemmung der Asparaginhydrolyse durch Ammoniak. Tatsächlich steht die Größe von K_{iash} (vgl. 3.3.1) mit 4 mM in guter Übereinstimmung mit dem Wert von K_{iat} .

3.5.4.4 Wie bereits erwähnt , läßt sich die enzymatische Synthese von Asp-ß-hydroxamat bei hohen Hydroxylaminkonzentrationen (> 0,1 M) nicht mehr nach der einfachen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik behandeln. EHRMAN et al. [24] haben dies ebenfalls beobachtet, führen die Abweichungen jedoch auf eine Störung des von diesen Autoren verwendeten Eisenchlorid-Tests zurück. Da dies für die Molybdatmethode (siehe 2.5.3.4) nicht zutrifft , sind wir der Ansicht, daß dieser Effekt von der Reaktion selbst herrührt.

Als mögliche Ursache kann man die enzymatische Synthese von O-ß-Aspartylhydroxylamin neben Asp-ß-hydroxamat in Betracht ziehen , die analog zu den in Abschnitt 3.5.3 behandelten nichtenzymatischen Reaktionen ablaufen kann, wenn das postulierte Zwischenprodukt F in Mechanismus I eine reaktive Acylverbindung darstellt. In diesem Fall würde man bei hohen Hydroxylaminkonzentrationen durch die Umwandlung des O-Acylprodukts zur Hydroxamsäure erhöhte Werte für v_n messen. Daß derartige Nebenreaktionen auch bei enzymkatalysierten Hydroxylaminolysen auftreten , ließ sich anhand der Hydroxamatbildung aus N-Acetyl-L-tyrosinäthylester in Gegenwart von α-Chymotrypsin demonstrieren [39]. Auch hier fand man bei hohen NH_2OH-Konzentrationen eine Zunahme des Quotienten v_n/v_w über das erwartete Maß hinaus. Mißt man die Reaktionsgeschwindigkeit als + d [Hydroxamat] / dt , ist eine außerordentlich komplexe Kinetik zu erwarten. Denkbar sind die folgenden Teilreaktionen , deren pH-Abhängigkeiten alle unter-

schiedlich sein können :



Bestimmt man bei nicht zu hohen [NH_2OH] echte Anfangsgeschwindigkeiten , kann man die Teilreaktionen 5 bis 7 vernachlässigen und erhält die einfache MICHAELIS - MENTEN - Kinetik.

Die bisher vorliegenden Daten zur Hydroxamatbildung in Gegenwart der Asparaginase reichen für eine befriedigende Interpretation der beobachteten Kinetik nicht aus. Sicherlich wäre es von Vorteil, Hydroxylamin durch ein anderes Nucleophil zu ersetzen , das nur ein Produkt liefert, das der enzymatischen Hydrolyse weniger leicht unterliegt als Asp - ß - hydroxamat. Geeignet ist wahrscheinlich Methylamin , das man zur Vereinfachung der analytischen Verfahren ^{14}C - markiert einsetzen kann.

3.6 ISOTOPENEFFEKTE IN D_2O

Die Geschwindigkeit Säure - Base - katalysierter Reaktionen nimmt häufig stark ab , wenn man sie in D_2O ablaufen läßt. Wasserstoffatome an O , N und S werden in diesem Lösungsmittel rasch gegen Deuteronen ausgetauscht , die mit geringerer Geschwindigkeit übertragen werden als Protonen . Eine ausführliche Diskussion von Isotopeneffekten findet man z. B. bei JENCKS [70]. Wir haben in einigen orientierenden Versuchen die Hydrolyse von Asp - ß - hydroxamat und die Hydroxylaminolyse von L - Asparagin in D_2O untersucht.

3.6.1 Methodik

a) Puffer : 105 mg Morpholinopropansulfonsäure (über P_4O_{10} getrocknet) wurden in 4 ml D_2O gelöst (99,8 % von SERVA, Heidelberg). Dann wurden 0,2 ml einer 4 %-igen Lösung von NaOD in D_2O zugegeben und mit D_2O auf 5 ml aufgefüllt. Dann wurde 1 ml dieses Puffers mit 5 µl einer Phenolrotlösung geeigneter Konzentration versetzt und das Absorptionsspektrum dieses Gemischs registriert. Dann wurde ein MOPS-Puffer derselben Konzentration in H_2O so hergestellt , daß das Spektrum einer Mischung von 99,5 Vol. dieses Puffers mit 0,5 Vol. Phenolrotlösung sich mit dem des Puffer/Phenolrot-Gemischs in D_2O deckte. Der pH-Wert des Puffers in H_2O betrug 7,6 .

b) Substrate: Je 17,9 mg Asp-ß-hydroxamat bzw. 13,6 mg L-Asparagin (wasserfrei) wurden in 1,0 ml H_2O bzw. D_2O gelöst.

Die freie Base des Hydroxylamins in kristalliner Form wurde nach l. c. 68 durch Chromatographie einer Lösung des Hydrochlorids in abs. Methanol an DOWEX 21 K und Fällen mit Äther hergestellt. Das Produkt wurde bei -25°C über P_4O_{10} aufbewahrt. Kurz vor Beginn der Experimente wurde ein Aliquot bei 37°C geschmolzen und 0,1 ml mit 0,4 ml eiskaltem D_2O gelöst. Die Konzentration dieser Lösung (etwa 6 M) wurde nach 2.5.3.3 bestimmt , hierauf wurden geeignete Verdünnungen mit kaltem D_2O bzw. H_2O hergestellt.

c) Inkubation: Zur Bestimmung der Hydroxamathydrolyse wurden bei 37° C Gemische von 0,9 ml Puffer und 0,1 ml Substratlösung mit 1 U Enzym in 20 µl H_2O inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,2 ml 12 %-iger Trichloressigsäure gestoppt. Das gebildete NH_2OH wurde nach 2.5.3.3 bestimmt.

Die Hydroxylaminolyse von Asparagin wurde nach 2.5.3.4 mit Ansätzen aus 0,8 ml Puffer , 0,1 ml Hydroxylaminlösung und 0,1 ml Asparagin - Stammlösung verfolgt. Gestartet wurde mit 0,1 ml Enzymlösung in H_2O . Die Ansätze enthielten hier also nur etwa 90 % Deuteriumoxid .

3.6.2 Ergebnisse

3.6.2.1 Hydrolyse

Die Aktivitäten gegenüber Asp-ß-hydroxamat wurden je dreimal in H_2O und 98 % D_2O gegen Leerwerte ohne Enzym bestimmt. Dabei ergaben sich die folgenden Mittelwerte :

in H_2O	in D_2O
225 ± 7 U/mg	86 ± 6 U/mg

Der beobachtete Isotopeneffekt ist also sp. Akt. $_{(H_2O)}$ / sp. Akt. $_{(D_2O)}$ = 2,6 .

3.6.2.2 Hydroxylaminolyse

Die Isotopeneffekte waren für drei Hydroxylaminkonzentrationen etwa gleich groß . Einzelheiten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen :

$[NH_2OH]$ [mM]	v_{n_3} in H_2O $10^3 \cdot \Delta E/min$	v_{n_3} in D_2O $10^3 \cdot \Delta E/min$	Quotient [a]
150	12,3	7,0	1,8
74	11,2	6,6	1,8
37	9,2	6,2	1,5

a) $v_n(H_2O) / v_n(D_2O)$

Der Effekt von D_2O entspricht formal dem eines unkompetitiven Inhibitors der Hydroxylaminolyse d. h. die LINEWEAVER-BURK Diagramme für H_2O und D_2O ergeben annähernd parallele Geraden.

3.6.3 Diskussion

Die beobachteten Isotopeneffekte liegen in der Größenordnung, die man erwarten sollte , wenn die geschwindigkeitsbestimmenden

Schritte beider Reaktionen mit der Übertragung von Protonen im Sinne einer Säure - Base - Katalyse verbunden sind (vgl. [69]). Die formal unkompetitive Hemmung der Hydroxamatbildung deutet auf eine erniedrigte Konstante k_2 in D_2O hin (vgl. Gleichung VII , S. 10). Daß die Bildung des Zwischenprodukts F in Mechanismus I der geschwindigkeitsbesstimmende Schritt ist , wird auch durch einen Vergleich der Maximalgeschwindigkeiten V_{xh} der Hydrolyse der verschiedenen Substrate nahegelegt, die sich um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden. Wenn alle diese Reaktionen über ein gemeinsames Zwischenprodukt verlaufen , kann die Geschwindigkeit der Umwandlung von F zu den Produkten nicht limitierend sein.

Allerdings kann man unsere bisherigen Resultate mit D_2O nicht als hinreichenden Beweis für eine solche Vorstellung werten. Da sich beim Übergang von H_2O zu D_2O sämtliche Protonierungsgleichgewichte im Enzym verschieben, können sich auch die pH-Abhängigkeiten der untersuchten Reaktionen und die Konformation des Enzymproteins ändern [70]. Um dies auszuschließen, wäre eine genaue Untersuchung der Kinetik der enzymatischen Reaktion bei mehreren pD - Werten erforderlich.

4 CHEMISCHE MODIFIZIERUNG DES ENZYMS

Als wertvolles Hilfsmittel zur Aufklärung des Mechanismus enzymatischer Reaktionen hat sich die chemische Modifizierung des Enzymproteins erwiesen , da ihr Einfluß auf die Enzymaktivität Informationen über die Natur der direkt oder indirekt an der Katalyse beteiligten Gruppen liefert. In den letzten Jahren sind zahlreiche Verfahren entwickelt worden, die es gestatten, funktionelle Gruppen von Proteinen unter so milden Bedingungen abzuwandeln , daß die Tertiärstruktur des Proteins weitgehend erhalten bleibt. Einen Überblick über derartige Methoden und wichtige Ergebnisse geben MEANS und FEENEY [71]. In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht durch Modifizierungsexperimente Aufschlüsse über die mögliche Rolle einiger Aminosäuren - insbesondere von Tyrosin und Histidin sowie der freien Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure - bei der Katalyse durch Asparaginase zu erhalten.

4.1 N^{α}- HALOGENACETYL - ASPARAGIN

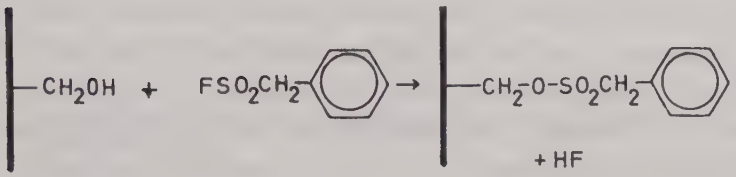
Bei einigen Enzymen ist es gelungen, durch Substratanaloge mit reaktiven Gruppen das aktive Zentrum spezifisch und irreversibel zu markieren. Beispiele für derartiges "affinity labelling" sind die Inaktivierung von Chymotrypsin durch das Chlormethylketon TPCK [72] und die Reaktion von Asparaginase mit DONV (Vgl. 1. 2. 3. 3). Mit derselben Zielsetzung haben wir den Einfluß von N^{α}- Bromacetyl - und N^{α}- Jodacetyl - L - asparagin auf Asparaginase untersucht. Die Verbindungen wurden analog zur Synthese des Chloracetylderivates [49] aus Asparagin und Bromacetylbromid bzw. Jodacetylchlorid dargestellt.

Asparaginase wurde bei 37^{o} C und pH - Werten von 4 , 7 und 10 mit den Halogenacetylderivaten in etwa 1000 fachem Überschuß je 60 min lang inkubiert. Dann wurde das Enzym an Sephadex G 25 ab -

getrennt und seine spezifische Aktivität mit der von Kontrollansätzen verglichen. In keinem Fall ließ sich signifikante Aktivitätsabnahme feststellen.

4.2 REAKTION DES ENZYMS MIT SULFONYLHALOGENIDEN

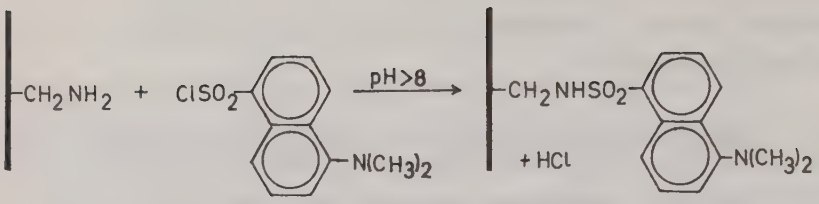
4.2.1 Phenylmethylsulfonylfluorid reagiert spezifisch mit der OH-Gruppe von Serinresten im aktiven Zentrum verschiedener Esterasen [73] unter Inaktivierung der Enzyme.



Wir fanden nach Inkubation von Asparaginase mit einem 1400-fachen molaren Überschuß von Phenylmethylsulfonylfluorid (30 min in Phosphatpuffer, pH 7,0, bei 37° C) keinerlei Aktivitätsabnahme.

4.2.2 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) bildet in mäßig alkalischer Lösung mit Proteinen fluoreszierende Konjugate. Es reagieren vor allem freie Aminogruppen aber auch phenolische OH-Gruppen des Tyrosins und der Imidazolring des Histidins [74, 75].

Die Extinktionskoeffizienten für proteingebundene Dansylreste sind von Fall zu Fall verschieden, als Mittelwert wird $3,4 \cdot 10^3$ $l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ angegeben [76].



4.2.2.1 Methodik

Die Ansätze waren nach l. c. 75 wie folgt zusammengesetzt : Zu einer Mischung aus 0,8 ml Puffer (0,2 M KH_2PO_4/NaOH , pH 6,0 und 8,0 ; 0,2 M Na_2HPO_4 , pH 9,0) und 0,4 ml abs . DMF wurden 0,2 ml einer 1%-igen Asparaginaselösung und 0,1 ml einer gesättigten Lösung von Dansylchlorid in Acetonitril (etwa 0,05 M) gegeben . Die Mischung (das Dansylchlorid fällt zum Teil wieder aus) wurde unter kräftigem Rühren 20 h bei 0° C inkubiert . Das modifizierte Enzym wurde an Sephadex G25m gereinigt (Elution mit 0,1 N NaCl)und das Eluat mit Phosphatpuffer , pH = 7,0, auf 10 ml aufgefüllt.

Der Modifizierungsgrad N [+)] wurde aus den Extinktionen bei 340 nm mit Hilfe des oben angegebenen Extinktionskoeffizienten abgeschätzt . Die Enzymaktivitäten wurden wie üblich nach 2.5.3.1 bestimmt und auf die Aktivität von Kontrollansätzen ohne Dansylchlorid bezogen .

4.2.2.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse für drei pH-Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt .

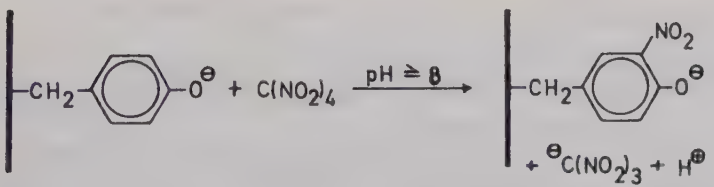
pH	6,0	8,0	9,0
N_{Dan} [+)]	≈ 5	≈ 20	≈ 30
rel. Akt. %	95	85	50

[+)] Unter dem Modifizierungsgrad verstehen wir hier und bei den weiteren Modifizierungsexperimenten die Anzahl der pro Enzymmolekül eingeführten Reste , bezogen auf ein Molekulargewicht von 140 000 für das tetramere Molekül.

Aus der Zunahme des Modifizierungsgrades mit dem pH-Wert kann man schließen, daß vorwiegend Lysin- und Tyrosinreste modifiziert worden sind. Obwohl bei pH 9 etwa 30 voluminöse Dansylreste in das Enzym eingeführt worden sind, bleibt die Aktivität weitgehend erhalten. Da die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von teildansylierten Enzymen durch Konformationsänderungen häufig deutlich beeinflußt werden, bietet die Untersuchung von solchen Molekülen in Gegenwart von Substraten oder Inhibitoren eine Möglichkeit, derartige Prozesse im Laufe der Katalyse nachzuweisen [74]. Einige Vorversuche, die wir mit Dansyl-Asparaginasen angestellt haben, lassen weitere Untersuchungen in dieser Richtung lohnend erscheinen.

4.3 MODIFIZIERUNG VON TYROSINRESTEN MIT TETRANITROMETHAN.

Durch Tetranitromethan (TNM) läßt sich Tyrosin schon unter sehr milden Bedingungen in das o-Nitroderivat überführen. Da das Phenolat-Anion reagiert, wird in schwach alkalischer Lösung gearbeitet. Die Modifizierungsgrade kann man aus der Absorption des Nitrotyrosins bei 428 nm ($= 4{,}1 \cdot 10^3$ $1\,Mol^{-1}cm^{-1}$ bei pH = 8,0) bestimmen [77].



Mit Natriumdithionit kann man das Nitroderivat zum o-Aminotyrosin reduzieren [78]. Dabei verschwindet die Nitrophenol-

absorption und eine neue Bande bei 300 nm erscheint. Gleichzeitig verschieben sich die pK_a - Werte der OH - Gruppen der Nitrotyrosine, die mit Werten um 7 um drei Einheiten unter denen des Tyrosins liegen, wieder in die Gegend von pH 10.

Die Nitrierung mit TNM ist unter geeigneten Bedingungen für Tyrosin nahezu spezifisch. Als Nebenreaktionen bei der Proteinmodifizierung kommen die Oxydation von SH - Gruppen [77] und die Nitrierung von Tryptophanresten [79] in Betracht. Außerdem kann es zur Vernetzung zwischen Proteinmolekülen kommen [80].

4.3.1 Methodik

a) Modifizierung : Nach l. c. 77 wurde Asparaginase A bei 25° C in 0,2 M TRIS-Puffer , pH = 8,0, mit TNM in 200 - 400 fachem Überschuß inkubiert. Die Extinktionszunahme bei 428 nm wurde kontinuierlich gegen einen Reagenzienleerwert registriert. Das modifizierte Enzym wurde über eine Säule (1 x 30 cm) mit Sephadex G 25 m (Elution mit TRIS - Puffer, pH 8,0) von niedermolekularen Verbind ungen befreit.

b) Reduktion : Das Nitro - Enzym (" NT - Asparaginase ") wurde bei pH 8,0 mit einem 700 fachen molaren Überschuß an Dithionit behandelt. Der Verlauf der Reaktion wurde ebenfalls bei 428 nm photometrisch verfolgt.

c) Aktivitätsbestimmung : Die Amidase - und Esteraseaktivitäten wurden nach 2.5.3.1 bzw. 2.5.3.7 bestimmt.

d) Disk - Elektrophorese : Proben der modifizierten Enzyme wurden wie in 2.5.2 beschrieben aufgetrennt.

4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

a) Die Nitrierung des Enzyms ist unter den gewählten Bedingungen bei einem 240 fachen molaren TNM - Überschuß nach etwa 2 h beendet. Die Reaktion verläuft mehrphasig : Wie man aus Diagrammen von log ($E_\infty - E_t$) gegen t erkennt, werden 8 Tyrosin -

reste schnell - innerhalb von etwa 10 min - nitriert ; nach weiteren 40 min Inkubation findet man 12 modifizierte Reste , weitere 4 Tyrosine reagieren mit einer Kinetik 1. Ordnung in den darauffolgenden 80 min ab . Insgesamt finden wir 16 ± 1 nitrierbare Tyrosinreste .

b) Die Reduktion des NT - Enzyms zur Aminotyrosin ("AT"-) - Asparaginase ist unter den beschriebenen Bedingungen nach 10 min quantitativ . Spektren des NT - und des AT - Enzyms sind in Abb. 19 dargestellt :

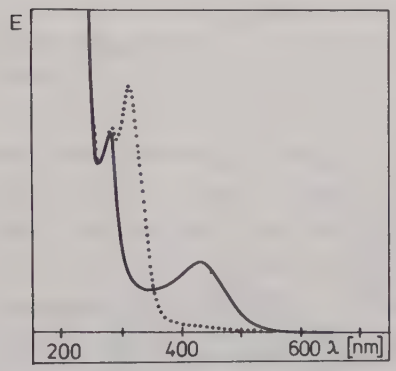


Abb. 19

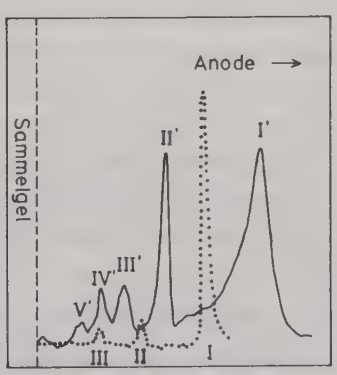


Abb . 20

Abb. 19 Absorptionsspektren von Nitrotyrosin - und Aminotyrosin - asparaginase . Modifizierungsgrad N = 16 , in 0,2 M TRIS - Puffer , pH = 8,0 .

Abb . 20 Disk - Elektropherogramme von nativer und NT - Asparaginase . Proben von unbehandelter Asparaginase A (•••••) und NT - Asparaginase , N = 16 (———) wurden im gleichen Gel bei pH 9,0 aufgetrennt. Die Proteinmengen waren unterschiedlich. Dargestellt sind Densitogramme nach Färbung mit Amidoschwarz 10B.

c) Die Aktivitäten der modifizierten Enzyme gegen Asparagin und Asp - ß - methylester sind auf 10 - 15 % gesenkt. Die pH - Abhängigkeiten der Asparaginase - und Esteraseaktivitäten im Vergleich zum nativen Enzym gehen aus Abb. 21 hervor.

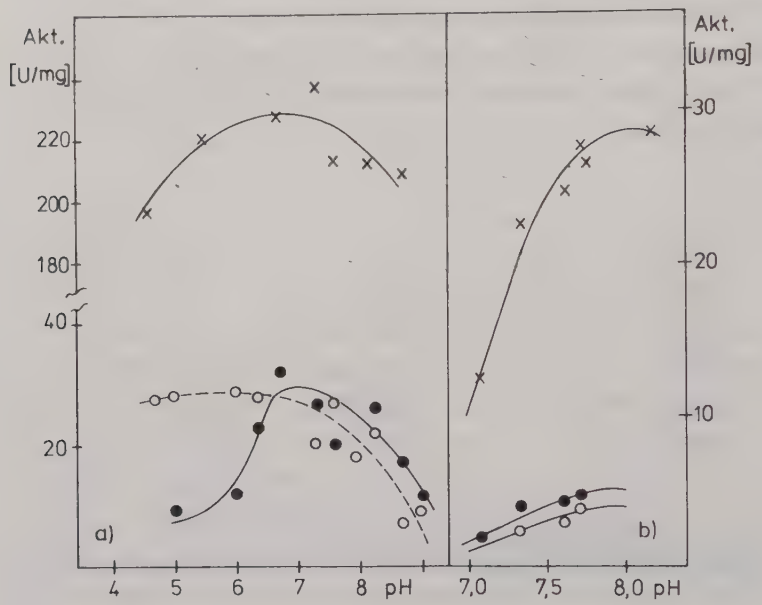


Abb. 21 Amidase - und Esteraseaktivität von Nitro - und Amino - tyrosin - Asparaginasen. Dargestellt sind in Abb. 21 a) die spez. Aktivitäten gegenüber L - Asparagin des unbehandelten Enzyms (X), der NT - Asparaginase, N = 16, (O) und der AT - Asparaginase (●) als Funktion des pH - Werts. Abb. 21 b) zeigt dieselben Beziehungen für die Hydrolyse von Asp - ß - methylester.

Im Einzelnen ergeben sich die folgenden Befunde:

ca) Amidaseaktivität: Die Reduktion des NT - Enzyms erhöht die Aktivität nicht signifikant. Während bei beiden modifizierten En -

zymen die Aktivität zum Alkalischen hin schneller abfällt als bei der nativen Asparaginase, zeigt im Sauren nur das AT - Enzym schnelle Inaktivierung zwischen pH 7 und 5.

cb) Esteraseaktivität : Die Esteraseaktivität wird bei der Nitrierung mit TNM um den gleichen Faktor erniedrigt wie die Amidaseaktivität. Auch hier wirkt sich die Reduktion mit Dithionit nur geringfügig aus. Die pH - Abhängigkeiten der beiden modifizierten Enzyme scheinen sich nicht wesentlich von der der unbehandelten Asparaginase zu unterscheiden.

d) Die Disk-Elektrophorese (siehe Abb. 20) zeigt, daß die Modifizierung des Enzyms mit TNM zu drastischen Veränderungen der Struktur des Enzymproteins führt. Da im NT - Enzym die pK_a - Werte der phenolischen OH - Gruppen des Tyrosins erniedrigt sind, muß man im Alkalischen erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit erwarten.. Daher ist Peak I' des NT - Enzyms wohl dem Peak I des nativen Enzyms zuzuordnen. Daneben entstehen jedoch neue Proteinspecies mit höheren Molekulargewichten. (II' bis V')

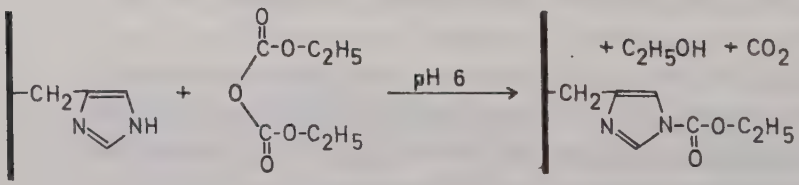
Das Proteinmuster des NT - Enzyms bleibt bei der Reduktion mit Dithionit erhalten , erwartungsgemäß gehen jedoch die elektrophoretischen Beweglichkeiten wieder zurück, ohne jedoch die des nativen Enzyms wieder zu erreichen. Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß während der Nitrierung durch kovalente Vernetzung zwischen Tyrosinresten verschiedener Moleküle oder auch intramolekular Aggregate gebildet werden (vgl. [80]). Da über deren spezifische Aktivitäten nichts bekannt ist, läßt sich der Einfluß der TNM-Behandlung auf die katalytische Aktivität nicht eindeutig interpretieren. Jedoch scheint keiner der zugänglichen Tyrosinreste für die Katalyse essentiell zu sein.

NISHIMURA et al. [21] fanden übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, daß sich mit TNM 15 von 44 Tyrosinresten der Aspa-

raginase nitrieren lassen , wobei eine Restaktivität von etwa 10 % verbleibt . Auch diese Autoren beobachteten , daß 8 dieser Reste besonders reaktiv sind. Fast der gesamte Aktivitätsverlust geht auf die Modifizierung dieser Gruppen zurück. FRANK et al. [19] konnten zeigen , daß sich im nativen Enzym nur 30 % aller Tyrosinreste (dies entspricht 11 - 12 Resten) durch Titration erfassen lassen. Mit Acetylimidazol kann man ebenfalls nur 11 - 12 Reste acetylieren (siehe Abschnitt 4.5). Offenbar sind also pro Untereinheit 4 Tyrosinreste zugänglich , von denen einer weder titrierbar noch acetylierbar ist.

4.4 MODIFIZIERUNG VON HISTIDINRESTEN MIT DIÄTHYL - PYROCARBONAT

Diäthylpyrocarbonat (DEP) - formal das Anhydrid der Äthoxyameisensäure - wird zum Sterilisieren von Lebensmitteln verwendet , da es stark baktericid wirkt und rasch in Äthanol und CO_2 zerfällt . MÜHLRAD et al. [81] sowie MELCHIOR und FAHRNEY [82] konnten zeigen, daß DEP mit Aminogruppen und vor allem mit Imidazolresten in Proteinen reagiert.



Das entstandene N - Äthoxyformylderivat des Histidins kann man aus der Absorption zwischen 230 und 240 nm leicht quantitativ bestimmen. Seine Stabilität in wässriger Lösung ist wesentlich höher als etwa die des N - Acetylimidazols , seine Halbwertszeit bei pH 7 und 25° C beträgt mehr als 2 Tage [82].

4.4.1 Spontanhydrolyse von DEP

Um die Stabilität des Reagenzes in Lösung beurteilen zu können, wurde die Spontanhydrolyse von DEP in Methanol/Puffer-Gemischen (1:1, v/v) bei 25°C und drei verschiedenen pH-Werten gemessen, indem das freigesetzte Äthanol enzymatisch mit Alkoholdehydrogenase (ADH-Test, BOEHRINGER, Mannheim) bestimmt wurde. Die Halbwertszeiten wurden wie üblich aus halblogarithmischen Diagrammen graphisch bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte:

Puffer	2,5 mM Phosph. pH = 8,0	2,5 mM Phosph. pH = 6,0	10 mM Citrat pH = 3,0
$t_{1/2}$ [min]	35	75	110

4.4.2 Extinktionskoeffizienten

Da die Literaturangaben über die Extinktionskoeffizienten von N-Äthoxyformylimidazol-Derivaten unzureichend sind, haben wir Werte für N-Acetyl-L-histidin und Glycyl-L-histidyl-L-leucin unter Bedingungen bestimmt, die mit denen der Modifizierung des Enzyms identisch waren. Die genannten Verbindungen (sie waren chromatographisch einheitlich) wurden in Konzentrationen von je 0,1 mM in 0,1 M KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH = 6,0, bei +4°C über Nacht mit DEP in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Alle Ansätze enthielten 7 % Äthanol. Dann wurden gegen Leerwerte ohne DEP Differenzspektren registriert.

Die Reaktionen verliefen unter diesen Bedingungen erst mit DEP-Anfangskonzentrationen von mehr als 40 mM quantitativ. Für die N-Äthoxyformylderivate beider Verbindungen ergaben sich bei 237 nm in guter Übereinstimmung molare Extinktionskoeffizienten von $13,8 \cdot 10^3$ $l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. Dieser Wert unterscheidet sich erheblich von Angaben für N-Äthoxyformyl-imidazol ($3,2 \cdot 10^3$ $l\,Mol^{-1}cm^{-1}$ bei 240 nm [81] und $3,0 \cdot 10^3$ $l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ bei 230 nm [82]).

N - Acetyl - L- tyrosinamid reagiert ebenfalls mit DEP , wobei die Extinktion zwischen 290 und 250 nm abnimmt. Differenzspektren für die Reaktion von Gly - his - leu und N - Acetyltyrosinamid mit Diäthylpyrocarbonat sind in Abb. 22 dargestellt.

4. 4. 3 Modifizierung von Asparaginase mit DEP

4. 4. 3. 1 Methodik

Die Ansätze enthielten in 2, 05 ml 0, 1 M KH_2PO_4/NaOH - Puffer, pH = 6, 0 , je 2 mg Asparaginase A , verschiedene Mengen DEP (5 - 60 μMol) und 7 % Äthanol. Ein Ansatz enthielt zusätzlich CBO - L - Asparagin in einer Konzentration von 5 mM. Nach 15 h Inkubation bei 4°C wurden Differenzspektren gegen Kontrollen ohne DEP aufgenommen. Zur Bestimmung der Modifizierungsgrade wurde der in 4. 4. 2 bestimmte Extinktionskoeffizient herangezogen.

Die Enzymaktivitäten wurden wie üblich nach 2. 5. 3. 1 und 2. 5. 3. 7 bestimmt.

4. 4. 3. 2 Ergebnisse

Das Differenzspektrum eines der Ansätze zeigt die Abb. 22. Die negative Extinktionsdifferenz zwischen 285 und 265 nm , die auch bei den übrigen Ansätzen auftrat , geht wahrscheinlich auf die Reaktion von Tyrosinresten zurück. Wir haben diesen Effekt jedoch nicht näher untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

[DEP] [mM]	ΔE_{237}	N_{His}	a) relative Aktivität %	
			Asn - ase	Esterase
0	----	----	100	100
0, 25	0, 031	0, 3	82	53
1, 2	0, 070	0, 7	69	--
2. 4	0, 075	0, 8	63	36

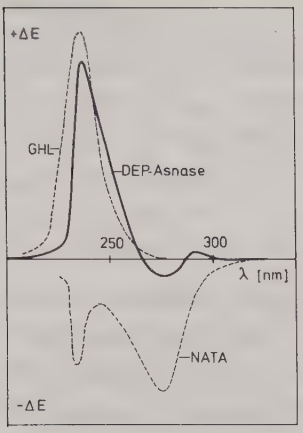


Abb. 22 Differenzspektren von Äthoxyformylderivaten
Vgl. 4. 4. 2 (GHL = Glycyl-histidyl-leucin, NATA = N-Acetyltyrosinamid) und 4. 4. 3. 1 (DEP-Asnase = modifiziertes Enzym). Die Extinktionseinheit ist beliebig.

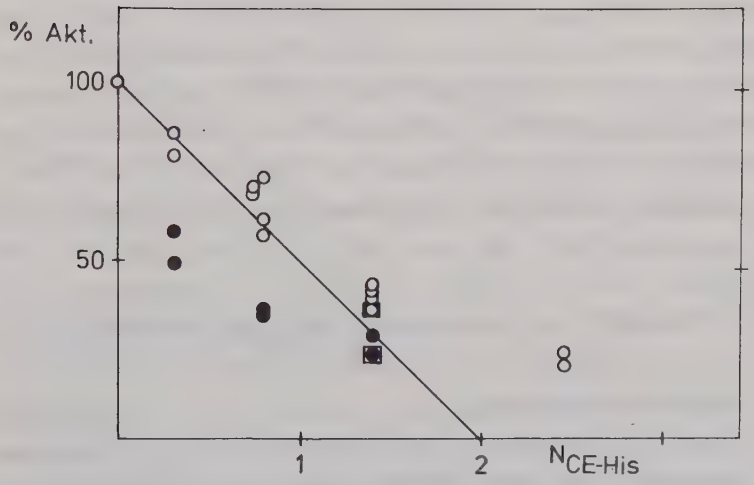


Abb. 23 Modifizierung mit Diäthylpyrocarbonat
Aufgetragen sind die relativen Aktivitäten (O = Amidase, ● = Esterase) gegen den Modifizierungsgrad. Die mit ⊡ bezeichneten Ansätze enthielten CBO-L-Asparagin.

Tabelle (Forts.)

[DEP] [mM]	ΔE_{237}	N_{His}	relative Aktivität a)	
			Asn-ase	Esterase
12,2	0,135	1,4	41	29
29,2	0,23	2,3	22	--

a) Mittelwert

Unter den Bedingungen des Experiments war mit DEP keine vollständige Inaktivierung zu erzielen. Mit zunehmendem Modifizierungsgrad scheint die Esteraseaktivität schneller abzufallen als die Amidaseaktivität. In Abb.23 sind die Ergebnisse nochmals graphisch dargestellt. Extrapoliert man den linearen Teil des Abfalls der Amidaseaktivität, erhält man einen Schnittpunkt mit der Abszisse bei $N_{His} = 2$. Man kann daher annehmen, daß die Äthoxyformylierung von 2 der 12 Histidinreste der Asparaginase den Ablauf des katalytischen Prozesses unmöglich macht. Die Gegenwart des kompetitiven Inhibitors CBO-L-Asparagin hat keinen Einfluß auf die Reaktivität dieser Gruppen gegenüber DEP.

Mit Hydroxylamin kann man Äthoxyformylderivate des Imidazols leicht deacylieren [82]. Wir haben daher 1 mg Äthoxyformyl-Asparaginase, N = 2,5, bei pH 7 und 25°C mit Hydroxylamin (0,1 M) behandelt. Nach Dialyse gegen Phosphatpuffer fanden wir eine Aktivität von 55 % der Kontrolle gegenüber einem Wert von 22% vor der Deacylierung.

4.5 MODIFIZIERUNG VON TYROSINRESTEN MIT N-ACETYL-IMIDAZOL

Bei neutralen pH-Werten und in Abwesenheit von Sulfhydrylgruppen reagieren Proteine mit N-Acetylimidazol (NACI) bevorzugt

unter Bildung von O- Acetyltyrosin-Derivaten [83].

4.5.1 Methodik

N- Acetylimidazol wurde zweimal aus trockenem Benzol umkristallisiert und über P_4O_{10} aufbewahrt. Zur Modifizierung wurde nach l.c. 83 ein geeignetes Volumen einer Stammlösung von NACI in Benzol in einer Küvette unter N_2 bei 40°C zur Trockne eingedampft. Die Lösung des Enzyms in Phosphatpuffer, pH = 7,5, wurde zugegeben und die Reaktion bei 278 nm photometrisch verfolgt. Nach 1-2 Stunden ist die Reaktion beendet. Das modifizierte Enzym wurde an Sephadex G 25m gereinigt (Elution mit Phosphatpuffer, pH = 7,5). Der Modifizierungsgrad wurde aus der Zunahme der Extinktion bei 278 nm während der Deacylierung mit Hydroxylamin bestimmt [83].

4.5.2 Ergebnisse

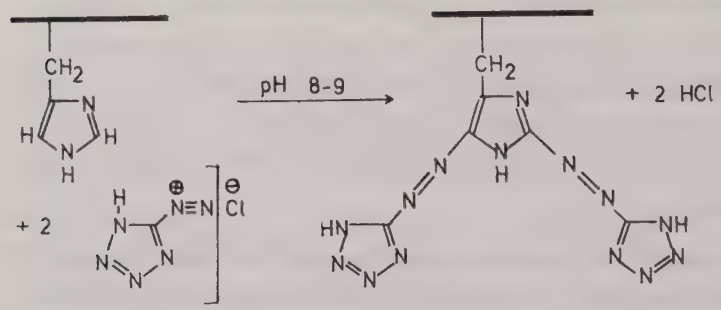
Zur vollständigen Acetylierung des Enzyms ist ein 400 facher molarer NACI-Überschuß erforderlich. Dabei werden 12 ± 2 Tyrosinreste (Mittelwert aus 4 Versuchen) modifiziert. Die Amidaseaktivität fällt dadurch auf 60 %, nach Deacylierung und Dialyse finden wir wieder 90 bis 95 % der Aktivität der nativen Asparaginase.

Auch diese Befunde lassen den Schluß zu, daß keiner der zugänglichen Tyrosinreste für die Katalyse von wesentlicher Bedeutung ist (vgl. 4.3.2).

4.6 MODIFIZIERUNG VON HISTIDIN - UND TYROSINRESTEN MIT DIAZO-1H-TETRAZOL

Die Modifizierung von Proteinen durch Kupplung mit Diazoniumsalzen wird bei der Farbreaktion nach PAULY [84] schon lange zu ihrem Nachweis verwendet. Das vor einigen Jahren eingeführte Diazo-1H-tetrazol (DHT) ist als Diazoniumkomponente besonders gut geeignet, da man bei hohem DHT-Überschuß aus-

schließlich Bisazoderivate des Histidins und Tyrosins erhält, die man nebeneinander bestimmen kann, da ihre Absorptionsmaxima im Sichtbaren weit genug getrennt sind [85]. Auch ε- Aminogruppen des Lysins reagieren mit DHT unter Bildung von Triazenderivaten, die jedoch im Sichtbaren nicht absorbieren [86].



4.6.1 Methodik

Lösungen von DHT wurden nach l.c. 85 durch Diazotierung von 5- Aminotetrazol hergestellt. Ihre Konzentration wurde durch Umsetzung mit N- Acetyltyrosinamid bestimmt [85].

Das Enzym wurde vor der Kupplung nach 4.5.1 mit NACI peracetyliert, um die Reaktion von DHT mit Tyrosinresten zurückzudrängen. Die so modifizierte Asparaginase wurde in Phosphatpuffer, pH = 7,5, mit DHT inkubiert. Während der Inkubation wurden Proben entnommen und in Küvetten mit demselben Volumen 0,5 M TRIS- Puffer, pH = 8,8, gemischt. Dies beendet die Reaktion, da die Aminogruppen des Puffers das überschüssige DHT abfangen [86]. Die Anzahl der bisazotierten Histidin- und Tyrosinreste wurde nach Angaben von SOKOLOVSKY und VALLEE [85] aus den Extinktionen bei 550 und 478 nm berechnet. Bei pH 8,8 gilt :

$$[\text{Bisazo - Tyr}] = E_{550} / 1,38 \cdot 10^4 \text{ Mol/l und}$$

$$[\text{Bisazo - His}] = (E_{478} - (E_{550}/2)) / 2,05 \cdot 10^4 \text{ Mol/l.}$$

Dabei ist vorausgesetzt, daß ausschließlich Bisazoprodukte entstehen und daß die mit einfachen His- und Tyr- Derivaten ermittelten Extinktionskoeffizienten auch auf die entsprechenden Gruppierungen im Protein anwendbar sind.

Enzymaktivitäten wurden wie üblich nach 2. 5. 3. 1 und 2. 5. 3. 7 bestimmt.

4. 6. 2 Ergebnisse und Diskussion

Versuch a) : 36 nMol peracetylierte Asparaginase A in 4, 5 ml Puffer wurden bei 25°C mit einem 800 fachen molaren DHT - Überschuß 100 min inkubiert.

Dabei verschwanden Amidase- und Esteraseaktivität vollständig. 6, 5 Histidin- und 15, 5 Tyrosinreste wurden bisazotiert. Behandeln mit Hydroxylamin führte zu keiner Änderung der Extinktion bei 278 nm (vgl. 4. 5. 1). Da unter den Bedingungen dieses Experiments offenbar quantitative Deacylierung der O- Acetyltyrosinreste eingetreten war, wurde der Versuch bei tiefer Temperatur und mit geringerer DHT - Konzentration wiederholt.

Versuch b) : 46 nMol Acetylenzym wurden bei 0°C mit einem 600 fachen DHT - Überschuß umgesetzt. Während der Inkubation wurden Proben von 1, 0 ml entnommen und weiter verfahren wie oben beschrieben.

Auch in diesem Versuch wurde das Enzym rasch und vollständig inaktiviert. Jedoch reagierten innerhalb von zwei Stunden nur je 4 Histidin- und Tyrosinreste mit DHT. Durch Deacylierung mit Hydroxylamin ließ sich zeigen, daß 11 Tyrosinreste im acetylierten Zustand verblieben waren.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in der folgenden Tabelle aufgeführt :

$t_{Ink.}$ [min]	0	2	9	17	25	49	107
Akt. [U/mg]	151	45	10	0	0	0	0
E_{550}	-----	0,029	0,072	0,082	0,103	0,086	0,136
E_{478}	-----	0,080	0,133	0,148	0,190	0,180	0,259
N_{His}	-----	1,2	1,8	2,0	2,6	2,5	3,5
N_{Tyr}	-----	0,8	2,0	2,3	2,9	2,4	3,8

In Abb. 24 sind dieselben Daten graphisch dargestellt. Man erkennt, daß die Modifizierung von zwei Histidin- (und Tyrosin-) Resten zur totalen Zerstörung der Enyzmaktivität führt.

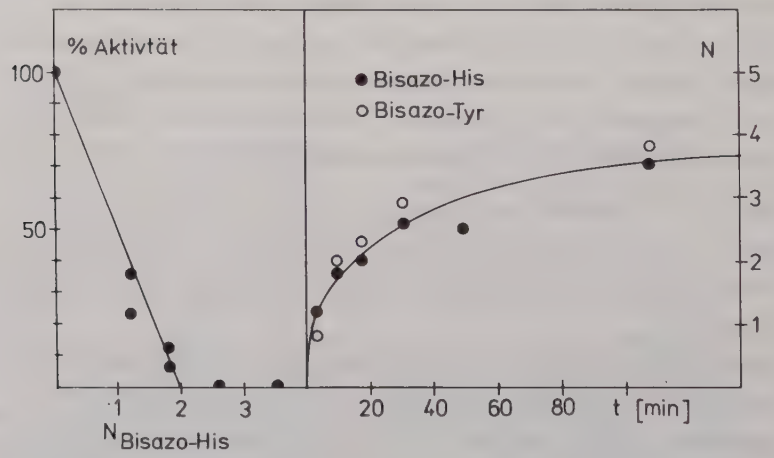


Abb. 24 Kupplung von Asparaginase mit Diazo-1H-tetrazol. Dargestellt sind a) die relativen Aktivitäten als Funktion von $N_{BisazoHis}$ und b) die Modifizierungsgrade von His und Tyr in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Um ausschließen zu können, daß der Aktivitätsverlust auf die Modifizierung der Tyrosinreste mit DHT zurückgeht, wurde das Kupplungsexperiment mit Nitro- Asparaginase (vgl. 4.3.1) wiederholt, da o- Nitrotyrosin nicht mit DHT kuppelt.[+)]

Versuch c) : 10 nMol Nitro- Asparaginase, N = 16, wurden bei $0^{o}C$ mit einem 80 fachen DHT- Überschuß behandelt. Da die Absorption von Bisazohistidin mit der von Nitrotyrosin zusammenfällt, ließen sich die Modifizierungsgrade hier nicht exakt bestimmen. Sie lagen jedoch unter $N_{Bisazo-His} = 1,5$. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationsdauer ergibt sich aus der folgenden Tabelle :

Ansatz Nr.	1	2	3	4
$t_{Ink.}$ [min]	0	2	6	15
rel. Akt. (Asnase) %	100	66	45	23
rel. Akt. (Esterase)	100	49	35	29

Die Kinetik der Hydrolyse von Asp- ß- methylester durch Nitro- asparaginase und zwei teilmodifizierte Nitro- Azo- Enzyme (Ansätze 2 und 3) wurden nach 2.5.3.1 b) untersucht. Die LINE- WEAVER- BURK- Diagramme für diese Reaktionen sind in Abb. 25 dargestellt.

Da auch das erschöpfend nitrierte Enzym durch DHT inaktiviert wird, nehmen wir an, daß dieser Aktivitätsverlust auf die Modifizierung von zwei Histidinresten zurückzuführen ist. Ein Hinweis auf die Berechtigung dieser Annahme ist unser Befund, daß auch die Inaktivierung des Enzyms durch Diäthylpyrocarbonat mit der Modifizierung von zwei Histidinresten einhergeht.

Die Kinetik der Esterspaltung durch die untersuchten Nitro - Azo -

[+)] Dipl.-Biochem. H. G. Löffler, persönliche Mitteilung

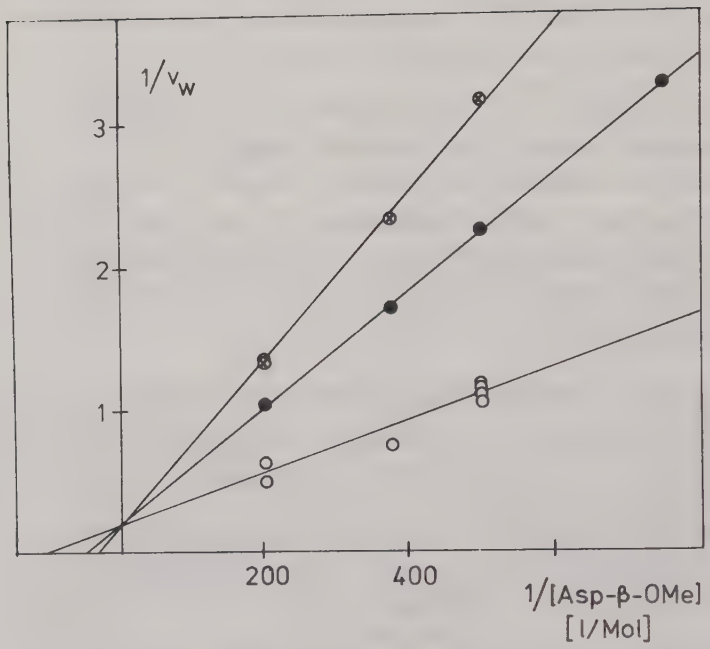
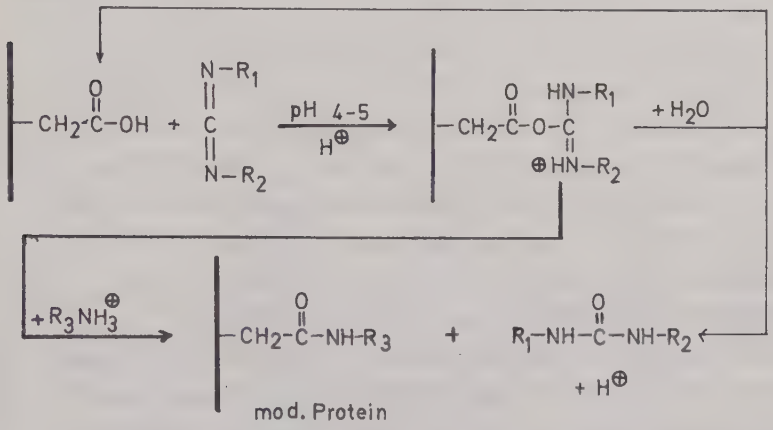


Abb. 25 Kinetik der Esterasewirkung modifizierter Asparaginasen. Die Geschwindigkeiten v_w wurden bei 25°C nach 2.5.3.1 b) in 0,05 M TRIS-Puffer, pH = 7,5, bestimmt. Die Einheit von v_w ist beliebig. Enzyme: Nitro-Asparaginase (O), Azo-Nitro-Asparginase 2 (●) und Azo-Nitro-Asparaginase 3 (⊗). Vgl. 4.6.2 c).

Enzyme ist insofern überaschend, als sich das formale Bild einer kompetitive Hemmung ergibt. Offenbar läßt sich also der Einfluß der modifizierten Histidinreste auf die Aktivität durch hohe Substratkonzentrationen kompensieren. Nähme durch die Modifizierung die Konzentration an aktivem Enzym - also $[E]_o$ - ab, hätte sich formal ein nichtkompetitiver Hemmtyp ergeben müssen.

4.7 MODIFIZIERUNG VON CARBOXYLGRUPPEN MIT CARBODIIMID UND NUCLEOPHIL.

Freie Carboxylgruppen in Proteinen lassen sich unter sehr schonenden Bedingungen in Amidfunktionen überführen, wenn man sie durch wasserlösliche Carbodiimide aktiviert [88]. Wahrscheinlich entstehen zunächst O- Acylisoharnstoff- Derivate, die mit Aminen zu Säureamiden weiterreagieren oder hydrolytisch gespalten werden.



Daneben können relativ stabile Isoharnstoffderivate des Tyrosins bzw. Isothioharnstoffverbindungen mit Cysteinresten entstehen (vgl. [71]). Als Nucleophile eignen sich z.B. Glycinester oder Taurin, das zu besser wasserlöslichen Produkten führt. Der Modifizierungsgrad kann aus Aminosäureanalysen oder durch Verwendung von ^{14}C - markiertem Nucleophil ermittelt werden.

4.7.1 Methodik

In Vorversuchen erwies sich das folgende Verfahren als günstig: Im Reaktionsgefäß des pH- Staten wurden bei + 10°C 106 mg (0,3 mMol)

N - Cyclohexyl - N -(ß - [N'- methylmorpholino]- äthyl)- carbodiimid - p - toluolsulfonat (CMC) in 2,0 ml einer 0,1 molaren Lösung von ^{14}C - Glycinäthylester · HCl (2,05 µC/mMol) in Wasser gelöst. Dann wurde ein pH - Wert von 4,8 eingestellt. Die Reaktion wurde sofort darauf durch Zugabe von 0,5 ml einer 2%- igen Asparaginaselösung in 0,1 N NaCl gestartet. Im weiteren Verlauf des Experiments wurde der pH - Wert durch automatische Titration mit 0,5 N HCl konstant gehalten. Während der Inkubation wurden Proben von 0,2 ml entnommen und sofort mit 0,8 ml 1 M Acetatpuffer, pH = 4,8 , gemischt , um das überschüssige CMC abzufangen. Diese Lösungen wurden dann bei 4°C gegen 4 mal 5 l eines 0,05 molaren Acetatpuffers, pH = 5,0 , von den Reagenzien befreit und auf je 2,5 ml aufgefüllt. Hierauf wurden aus der Extinktion bei 278 nm die Proteinkonzentrationen ermittelt ; je 0,2 ml wurden zur Bestimmung der Enzymaktivität nach 2. 5. 3. 1 entnommen.

Hierauf wurden die Proben lyophilisiert und in 0,5 ml 1 N NaOH aufgenommen. Um ausreichende Löslichkeit in der Scintillationslösung zu gewährleisten, wurden die Ansätze zur teilweisen Hydrolyse des Proteins über Nacht bei 50°C belassen , dann mit je 0,5 ml 2 N Trichloressigsäure versetzt und mit 15 ml Dioxan - Scintillator nach BRAY [89] quantitativ in Zählgefäße überführt. Die Radioaktivität der Proben wurde schließlich im "Tri-Carb"- Scintillationszähler (PACKARD, Modell 3003) ausgezählt. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurden jedem Ansatz 20 µl ^{14}C - Toluol mit bekannter spez. Radioaktivität zugesetzt und nochmals gezählt. Für 10 peptidhaltige Ansätze ergab sich eine mittlere Zählausbeute von 55 ± 3 %.

Die Modifizierungsgrade ließen sich nunmehr aus den korrigierten Zählraten , der spezifischen Radioaktivität des vorgelegten Glycinäthylesters und den Proteinkonzentrationen berechnen.

4.7.2 Ergebnisse und Diskussion

Während der Inkubation des Enzyms mit CMC begann nach etwa 15 min Protein auszufallen.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten und des Modifizierungsgrades von der Inkubationsdauer geht aus der folgenden Tabelle hervor. Die gleichen Daten sind in Abb. 26 graphisch dargestellt.

$t_{Ink.}$ [min]	dpm/mg Prot. [a)]	N [b)]	Akt. [U/mg]
1	320	10	159
2	450	14	---
4	900	28	136
6	783	24	135
10	1375	42	120
15	1156	35	95
20	1245	38	--
31	1626	50	68
40	1313	41	--
60	1640	50	46

a) korrigierte Zählraten, bezogen auf die Proteinkonzentration vor dem Lyophilisieren.

b) Reste Glycinäthylester/Molekül

Asparaginase A enthält mehr als 150 freie Carboxylgruppen [11]. Unter den Bedingungen unserer Versuche sind der Modifizierung mit CMC/Glycinäthylester durchschnittlich etwa 50 dieser Gruppen zugänglich, von denen keine für die enzymatische Aktivität essentiell zu sein scheint. Vergleicht man die formalen Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung für Modifizierung und Aktivitätsverlust, die man aus Diagrammen von log (50/N) bzw.

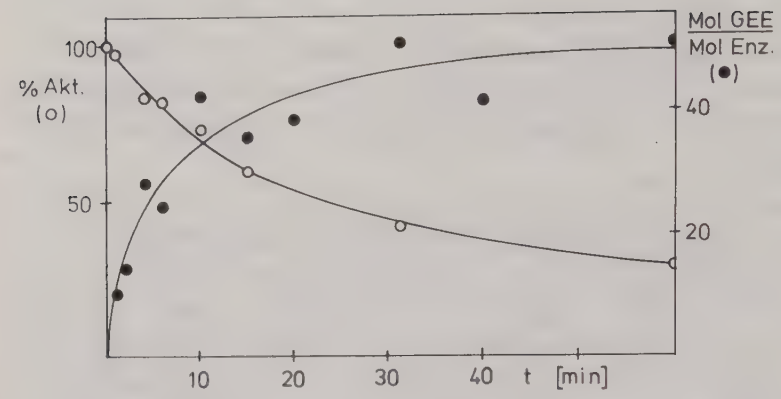


Abb. 26 Modifizierung von Asparaginase mit CMC/Glycinäthylester. Aufgetragen sind der Modifizierungsgrad (●) und die Aktivität der Proben in % der Kontrolle (O) gegen die Inkubationsdauer.

log (Akt.$_{t=0}$/Akt.$_{t}$) gegen $t_{Ink.}$ abschätzen kann, ergibt sich, daß die Modifizierung - solange das gesamte Protein gelöst ist - etwa 10 mal schneller verläuft als die Inaktivierung des Enzyms.

Nicht auszuschließen ist dabei allerdings, daß eine funktionelle Carboxylgruppe im aktiven Zentrum aus sterischen Gründen mit dem sperrigen CMC nicht reagiert. Dies könnte man durch ein ähnliches Experiment mit dem weniger voluminösen 1-Äthyl-3-dimethylaminopropyl-carbodiimid überprüfen.

5 DISKUSSION

5.1 Wenn wir im Folgenden einen detaillierten Mechanismus für die durch Asparaginase aus E. coli katalysierten Reaktionen vorschlagen, verstehen wir ihn vor allem als Arbeitshypothese und sind uns darüber klar, daß die vorliegenden Daten nicht ausreichen, um mehr als hypothetische Vorstellungen über den molekularen Ablauf der Katalyse zu entwickeln. Selbst bei Enzymen wie α-Chymotrypsin oder Ribonuclease A, die seit mehr als einem Jahrzehnt von zahlreichen Arbeitsgruppen mit hohem experimentellem Aufwand untersucht werden, bestehen noch tiefgreifende Unklarheiten über Einzelheiten der Reaktionsmechanismen und dies, obwohl die Topographie ihrer aktiven Zentren durch röntgenographische und viele andere Befunde bis ins Detail bekannt ist.

Ein sinnvoller Vorschlag für den Mechanismus der E. coli-Asparaginase muß nicht nur mit der beobachteten steady-state-Kinetik in Einklang stehen, sondern soll auch die Vielfalt der möglichen Aktivitäten, die Substratspezifität und die Ergebnisse von Modifizierungsexperimenten zur Rolle funktioneller Gruppen des Enzyms verständlich machen können. Außerdem sollten sich nichtenzymatische Modellreaktionen auffinden lassen, die demonstrieren daß der geforderte Mechanismus " chemisch möglich " ist und Anhaltspunkte dafür liefern, ob er mit der beobachteten Geschwindigkeit ablaufen kann.

5.2 Wenn man annimmt, daß der formale Mechanismus I zutrifft - und es gibt bisher keine Befunde, die ihn ausschließen - stellt sich die Frage nach der Natur des Zwischenprodukts F, über die ja in I nichts vorausgesetzt wurde.

5.2.1 Bei vielen Hydrolasen mit ähnlicher Kinetik zeigte es sich, daß man F als Acylenzym auffassen muß, in dem ein Acylrest

esterartig mit der OH-Gruppe eines Serins (Chymotrypsin, Acetylcholinesterase) oder in einem Thioester mit der SH-Gruppe von Cystein (Papain, Ficin) verknüpft ist. Denkbar sind weiterhin O-Acylderivate des Tyrosins oder N-Acylverbindungen des Imidazols von Histidin oder von primären Aminogruppen des Lysins. Schließlich kann man die Bildung gemischter Säureanhydride mit Carboxylgruppen von Asparaginsäure oder Glutaminsäure in Betracht ziehen . In jedem Fall sollte die irreversible Blockierung einer funktionellen Gruppe , die im Laufe der Katalyse den Acylrest übernimmt , zur vollständigen Zerstörung der Enzymaktivität führen.

Die bisher durchgeführten Modifizierungsexperimente an Asparaginase (siehe 1.2.3.3 und Abschnitt 4) geben keine klaren Anhaltspunkte für eine der erwähnten Möglichkeiten. Freie SH-Gruppen sind im Molekül nicht vorhanden. DFP und Phenylmethylsulfonylfluorid , die OH-Gruppen des Serins blockieren, haben keinen Einfluß auf die Aktivität. Die Acetylierung aller zugänglichen Tyrosinreste senkt die Enyzmaktivität nur unwesentlich . Dasselbe gilt für die Acylierung von Aminogruppen. Daß die Species F das Säureamidderivat des Enzyms mit Asparaginsäure darstellt , ist ohnehin nicht sehr wahrscheinlich , da der Gewinn einer solchen Umamidierung für die Katalyse nicht ersichtlich ist . Daher muß man die Zerstörung der Enzymaktivität durch Modifizierung von Aminogruppen mit CFQ [21] wohl anders interpretieren. Durch Umsetzung mit Glycinäthylester in Gegenwart von CMC schließlich lassen sich ohne tiefgreifenden Einfluß auf die enzymatische Aktivität etwa 50 Carboxylgruppen blockieren.

Die Inaktivierung von Asparaginase durch Modifizierung von zwei Histidinresten mit DEP oder Diazo-1H-tetrazol läßt die Existenz eines am Histidin acylierten Enzyms denkbar erscheinen. Allerdings steht die Kinetik des modifizierten Enzyms im Widerspruch zu dieser Vorstellung (vgl. Abb. 25). Auch die beobachtete

pH - Abhängigkeit der Hydrolyse von Asparagin läßt sich damit nicht in Einklang bringen. Läge nämlich nucleophile Katalyse durch Imidazol vor , sollte man im Bereich der pK_a - Werte der Histidinreste des Enzyms (pH 5, 5 bis 7, 5) starke Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH - Wert beobachten . Dies ist jedoch nicht der Fall .

Natürlich besteht die Möglichkeit , daß sich eine für die Ausbildung des Acylenzyms verantwortliche funktionelle Gruppe mit den verwendeten Reagenzien nicht erfassen läßt. Meist findet man jedoch, daß gerade solche Gruppen besonders reaktiv sind.

5. 2. 2 Die Substratspezifität der E . coli - Asparaginase läßt sich wie folgt charakterisieren (vgl. Tabelle II) :

a) α - Carboxylgruppe
Es werden nur Verbindungen umgesetzt , deren α - Carboxylfunktion frei ist . L - Asp - diamid und L - Asp - dimethylester sind keine Substrate . Das Diamid hemmt jedoch die Hydrolyse von Asparagin kompetitiv , kann also gebunden werden .

b) α - Aminogruppe
Von den geprüften Substratanalogen werden nur diejenigen gebunden , deren α - Aminogruppe frei ist oder bei Substitution noch basischen Charakter besitzt (DL - N^{α} - Äthylasparagin) . Acylierung der Aminogruppe verringert deren Basizität um Größenordnungen . N^{α} - Chloracetylasparagin wird nicht mehr umgesetzt , DL - α - Chlorsuccinamid ist weder Substrat noch Inhibitor. Während ALLISON et al. [90] berichten , daß L - Alanyl - L - Asparagin mit einer relativen Aktivität von 94 % desamidiert wird , finden wir mit Glycyl - L - Asparagin keine Aktivität. CBO - L - Asparagin und CBO - L - Asparaginsäure hemmen . Ihre Bindung an das Enzym könnte durch eine Aromatenwechselwirkung vermittelt werden , wie sie auch für eine Asparaginase aus Rattenleber angenommen werden muß, die

durch Verbindungen wie CBO - L - Phenylalanin oder CBO - S - Benzyl - L - cystein gehemmt wird. Letzteres hemmt allerdings E. coli - Asparaginase nicht.

c) ß - Acylfunktion

Auch die ß - Carbonylgruppe scheint an der Substratbindung beteiligt zu sein. Dies kann man aus der Tatsache schließen, daß $\alpha,ß$ - Diaminopropionsäure und α,γ - Diaminobuttersäure nicht hemmen, obwohl sie eine intakte α - Aminosäuregruppierung besitzen. Möglicherweise kann man so auch die überaschend hohe MICHAELIS - Konstante des Asp - ß - hydroxamats erklären [+]. Es ist nämlich bekannt, daß Hydroxamsäuren stabile Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonylsauerstoff und der OH - Gruppe des Hydroxamsäurerestes ausbilden. Ist an der Substratbindung eine Wasserstoffbrücke vom Enyzm zur ß - Carbonylfunktion der Substrate beteiligt, sollte die Bindung des Hydroxamats erschwert sein.

Nicht auszuschließen ist auch, daß die - NH - Gruppierung der Amidsubstrate eine Rolle spielt. Darauf weisen die hohen Bindungskonstanten der Estersubstrate hin [+]. So ist die MICHAELIS - Konstante des Asp - ß - methylesters um fast 3 Zehnerpotenzen höher als die des ß - Methylamids, obwohl sich die Gruppen $-CO-OCH_3$ und $-CO-NHCH_3$ in ihrer Raumerfüllung nur geringfügig unterscheiden.

Verbindungen mit voluminösen Substituenten in ß - Stellung werden nicht oder nur sehr langsam umgesetzt (Asp - ß - Benzylester und DL - Asp - ß - p - nitroanilid).

[+] Natürlich sind die kinetisch ermittelten MICHAELIS - Konstanten nicht mit den Substratbindungskonstanten K_s identisch. Aus III und IV, S. 8/9, kann man jedoch ableiten, daß $V_{max}/K_m[E]_o = k_2/K_s$, sofern $k_2 \ll k_{-1}$. Haben also zwei Substrate vergleichbare Maximalgeschwindigkeiten, ist das Verhältnis ihrer MICHELIS - Konstanten nicht allzu verschieden vom Verhältnis ihrer Substratbindungskonstanten.

BULL und BREESE [92] haben gefunden, daß die Amidgruppen von Asparagin und Glutamin in Proteinen stark hydrophoben Charakter besitzen. Man kann daher daran denken, daß auch bei der Bindung der Amidsubstrate an Asparaginase hydrophobe Wechselwirkungen von Bedeutung sind. Auch diese Annahme würde mit der beobachteten Substratspezifität übereinstimmen, da dann die Bindung von Substraten mit geladenen und damit hydratisierten Gruppen in ß-Stellung (α,γ-Diaminobuttersäure, L-Asparaginsäure) erschwert sein sollte.

5.2.3 Die pH-Abhängigkeit der Hydrolyse von L-Asparagin bietet wenig Information über die Natur von Gruppen, die an der Katalyse beteiligt sein können. Zwischen pH 5,5 und 8,5 ist die Aktivität nahezu pH-unabhängig; der Abfall der Enzymaktivität bei höheren und niedrigeren pH-Werten könnte auf die Dissoziation des Enzyms in Untereinheiten zurückgehen [15]. Während die halbe Maximalgeschwindigkeit mit L-Asparagin als Substrat schon bei pH 4 erreicht wird, liegt der Wendepunkt im pH-Aktivitätsprofil (der "$pV_{max}/2$"-Wert) der schlechten Substrate höher, so z.B. für D-Asparagin bei pH 5, für L-Glutamin bei 6 und für den ß-Methylester bei pH 7. (vgl. [22]). Im Alkalischen sind die pH-Aktivitätsprofile für alle Substrate identisch. $pV_{max}/2$ scheint linear von $\log (V_{max}/K_m)$ abzuhängen. Wie diese Beziehung zu erklären ist, wissen wir nicht.

5.3 Der pK_a-Wert der α-Aminogruppe des L-Asparagins liegt bei pH 8,8, der der α-Carboxylfunktion bei pH 2,2. Beide Gruppen liegen also fast im gesamten Aktivitätsbereich des Enzyms voll ionisiert vor. Wir nehmen nun an, daß

a) Die protonierte α-Aminogruppe der Substrate an der Bindung im aktiven Zentrum mitwirkt. Dafür sprechen die bereits

diskutierte Substratspezifität , aber auch der Befund , daß die Hemmung der Hydrolyse von Asp - ß - hydroxamat durch Ammoniak einen kompetitiven Anteil aufweist (vgl. 3. 3. 2) und auch Glycin ein kompetitiver Inhibitor ist.

b) daß auch die ß - Acylfunktion der Substrate die Bindung vermittelt und

c) daß die α - Carboxylgruppe der Substrate als Nucleophil an der Katalyse teilnimmt. Dabei entsteht nach Abspaltung von Ammoniak (bzw. Methylamin, Methanol etc.) als Zwischenprodukt F enzymgebundenes Asparaginsäureanhydrid das mit $OH^{\ominus}$ oder Hydroxylamin zu den Produkten Asparaginsäure bzw. Asp - ß - hydroxamat weiterreagiert oder mit NH_3 den ES - Komplex zurückbildet. Ein derartiger Mechanismus ist in Abb. 27 dargestellt.

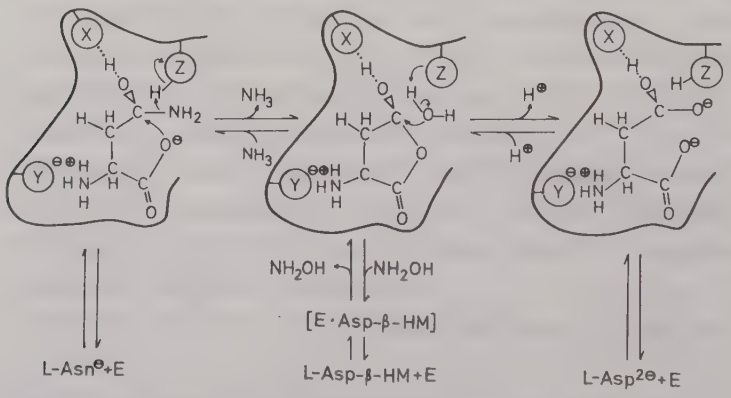


Abb. 27 Möglicher Mechanismus der E. coli - Asparaginase

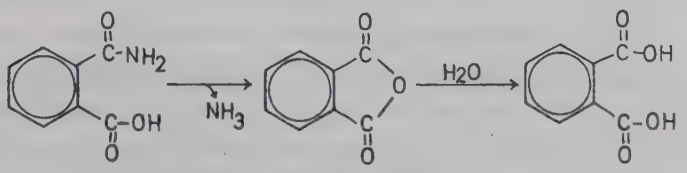
Eine wesentliche Funktion des Enzyms ist nach dieser Vorstellung die Fixierung der Substrate in einer Konformation, die die ß - Acylfunktion und das angreifende Carboxylat - Anion in unmittelbare räumliche Nachbarschaft bringt. Außerdem erhöht das

Enzym die Carbonylaktivität der Amid- oder Esterbindung und erleichtert damit die nucleophile Substitution weiter. Dies könnte durch Polarisierung der Carbonylgruppe über eine Wasserstoffbrücke (zu einer Gruppe -X-H des Enzyms, vgl. Abb. 27) und/oder durch spezifische Protonierung des austretenden Amins oder Alkohols geschehen.

5.4 Daß ein solcher Mechanismus nicht unrealistisch ist, läßt sich durch zahlreiche Modellreaktionen belegen, die zeigen, daß die intramolekulare nucleophile Katalyse durch Carboxylgruppen die Hydrolysegeschwindigkeit von Amiden und Estern um Größenordnungen erhöhen kann. Dabei entstehen in vielen Fällen intermediär cyclische Säureanhydride, sofern sich 5- oder 6-gliedrige Ringe ausbilden können, wie dies auch bei Asparaginsäureanhydrid der Fall ist. Diese Verbindung läßt sich nicht in reiner Form darstellen, da sie schnell polymerisiert, dagegen ist ihr CBO-Derivat leicht zu erhalten.

Erwartungsgemäß wird die Effektivität der intramolekularen COOH-Katalyse durch Einschränkung der freien Drehbarkeit im Molekül stark erhöht. Beispiele für diesen Reaktionstyp haben JENCKS [70] sowie BRUICE und BENKOVIC [93] zusammengestellt. Wir wollen hier nur einige wenige Fälle dikutieren.

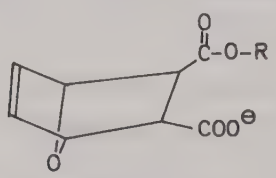
5.4.1 Die von BENDER et al. [94] untersuchte Hydrolyse von Phthalsäurehalbamid verläuft bei pH 3 etwa 100 000 mal schneller als die von Benzamid.



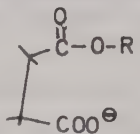
Aus der pH-Abhängigkeit der Reaktion geht hervor, daß die undissoziierte Carboxylgruppe katalytisch wirksam ist.

Carboxyl- und Amidgruppe sind durch den Aromaten starr fixiert. Das intermediäre Auftreten von Phthalsäureanhydrid läßt sich hier nur indirekt wahrscheinlich machen.

5.4.2 An einer Reihe von Halbestern der Bernstein- und Glutarsäure haben BRUICE und PANDIT [95] den Einfluß demonstriert, den die Ringgröße des Anhydrids und die Einschränkung der Drehbarkeit durch Substitution mit Methylgruppen auf die Hydrolysegeschwindigkeit haben. So wird der Mono-p-Bromphenylester der ß,ß-Dimethylglutarsäure etwa 20 mal, derjenige der Bernsteinsäure etwa 200 mal schneller solvolysiert als der entsprechende Glutarsäureester. Die Hydrolyse des Mono-p-Methoxyphenylesters der 3,6-Endoxo-Δ^4-tetrahydrophthalsäure (I) verläuft wiederum 230 mal schneller als die des analogen Bernsteinsäureesters (II).

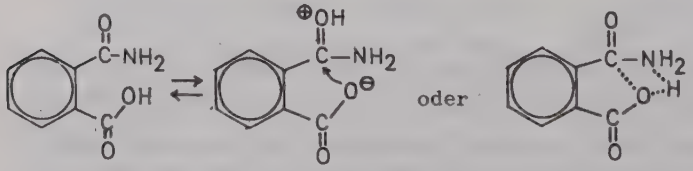


I



II

Die letztgenannten Reaktionen werden durch das Carboxylat-Anion katalysiert, während bei allen bisher untersuchten Amiden und den meisten Estern die protonierte Carboxylgruppe wirksam ist. Dies beruht darauf, daß die austretende Gruppe im Laufe der Katalyse protoniert werden muß. Dies kann durch das Proton der -COOH-Gruppe geschehen. Angreifendes Nucleophil ist in allen Fällen das Carboxylat-Anion. Beim Phthalsäuremonoamid kann man formulieren [93]:



Ist die austretende Gruppe ein "saurer" Alkohol, wie etwa bei Phenyl- oder Trifluoräthylestern , läuft die Katalyse auch in neutraler Lösung ab [96].

5. 4. 3 Bei der enzymatischen Reaktion kann die Protonierung der austretenden Gruppe durch eine funktionelle Gruppe des Enyzms erfolgen. (- Z - H in Abb. 27). Die dabei gebildete Base - Z könnte im weiteren Verlauf der Katalyse durch Übernahme eines Protons von einem Wassermolekül die Hydrolyse des Anyhdrids katalysieren . Für diese Vorstellungen existieren allerdings noch keine konkreten experimentellen Beweise . Immerhin sind unsere Ergebnisse mit D_2O (vgl. 3. 6. 3) damit durchaus vereinbar. Außerdem muß man erwarten , daß die Effektivität einer solchen Säure- Base- Katalyse durch Substitution des Amidstickstoffs der Substrate beeinflußt wird . Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der nucleophilen Substitution der Amidbindung vom pK_a-Wert des austretenden Amins geht aus Untersuchungen von FERSHT [97] über die Alkoholyse und Thiolyse einer Reihe von Acetamiden hervor. Qualitativ stimmen diese Befunde mit den beobachteten Substratspezifitäten der E. coli - Asparaginase und anderer Amidasen - z. B. der Glutaminase aus E. coli [98] - überein . So wird zum Beispiel L - Asp - ß - methylamid durch die von uns untersuchte Asparaginase mit einer relativen Aktivität von nur etwa 1 % umgesetzt , obwohl seine MICHAELIS - Konstante mit 0, 03 mM in derselben Größenordnung liegt , wie die des Asparagins[+)] . Dagegen ist der K_{hh} - Wert des ß - Hydroxamats bei nahezu gleicher Maximalgeschwindigkeit etwa 80 mal größer . Im ersten Fall kann man das beobachtete V_{sh} auf eine gegenüber Asparagin erhöhte , im zweiten auf eine verminderte Stabilität der Amidbindung zurückführen (pK_a - Werte : NH_2OH 6, 1 ; NH_3 9, 2 und CH_3NH_2 10, 7). Weiterhin sollten ungünstige sterische Verhältnisse im ES - Komplex die Säurekatalyse durch eine hypothetische Gruppe - Z - H be-

---

+) Vgl. Fußnote auf S. 80

einträchtigen . Die Hydrolyse von DL - Asp - ß - p - nitroanilid ist möglicherweise ein Beispiel : Die MICHAELIS - Konstante dieses Substrats ist mit 0,38 mM relativ niedrig , die Stabilität seiner Säureamidbindung weitaus geringer als etwa des des Asparagins . Trotzdem findet man nur minimale Aktivität (0,02 U/mg). Man kann sich vorstellen , daß der Aromat im ES - Komplex die Amidfunktion gegen die Gruppe - Z - H abschirmt und dadurch eine Säurekatalyse unmöglicht macht.

Wie EHRMAN et al. [24] gezeigt haben, katalysiert E. coli - Asparaginase - wie auch andere Amidasen (vgl. [98]) - den ^{18}O - Austausch zwischen $H_2{}^{18}O$ und Asparaginsäure . Die relative Aktivität ist mit 10 % ebenso groß wie die der Hydroxamatbildung aus Asparaginsäure in Gegenwart des Enzyms [24]. Geschwindigkeitsbestimmend ist offenbar in beiden Reaktionen die Cyclisierung der Dicarbosnäure zum Anhydrid , deren Ablauf man analog zur Bildung von F aus dem Amid formulieren kann (vgl. Abb. 27).

5.4.4 Als Modellreaktion , an der wir in wässriger Lösung und bei Zimmertemperatur sowohl intramolekulare COOH - Katalyse bei der Hydrolyse eines Amids und das Auftreten des intermediären Säureamids als auch die spontane Bildung des Anhydrids aus der Dicarbonsäure demonstrieren können, fanden wir die Hydrolyse von N - (2 - Aminoäthyl) - naphthalin - 1, 8 - dicarbonsäuremonoamid (III) , einer Verbindung , die schon 1925 von BISTRZYCKI und RISI [51] aus Naphthalsäureanhydrid (IV) und Äthylendiamin erhalten wurde. Den Autoren war aufgefallen , daß beim Lösen von III in verd. HCl fast momentan wieder das Anhydrid IV ausfällt.

Wir haben gefunden, daß sich die Bildung von IV aus III photometrisch leicht verfolgen läßt , da das Anhydrid in Wasser ein Absorptionsmaximum bei 339 nm ($\varepsilon = 1,3 \cdot 10^4$ $l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) hat, während das Amid III und die Naphthalsäure V Maxima in der

Gegend von 295 nm aufweisen (ε_{III} = 8,7 · 10^3 $l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, ε_V = 7,6 · 10^3 $l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). Spektren von III und IV sowie die Spektralkinetik der Reaktion III ⟶ IV zeigt die Abb. 28.

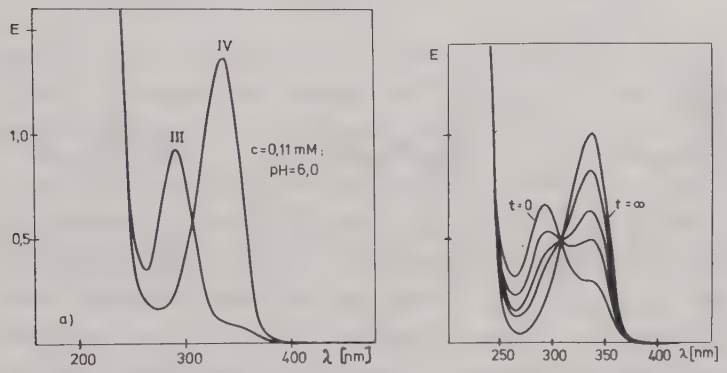


Abb. 28 Absorptionsspektren von N-(2-Aminoäthyl)-naphthalsäuremonoamid (III) und Naphthalsäureanhydrid (IV).

a) In McILVAINE-Puffer , pH = 6,0 ; c = 0,11 mM. Infolge der Labilität von III tritt im Spektrum dieser Verbindung bereits IV auf, was an der Schulter bei 340 nm zu erkennen ist .

b) Spektrale Änderungen bei der Hydrolyse von III bei pH = 2,3 unter Bildung von IV. III und IV besitzen einen isosbestischen Punkt bei 309 nm (ε = 5,4 · 10^3 $l\,Mol^{-1}cm^{-1}$).

Die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung für die Bildung von IV aus III hat bei pH 3,0 und 40° C einen Wert von 0,02 min^{-1}. Für die Hydrolyse von Phthalsäurehalbamid wurde beim selben pH-Wert und einer Temperatur von 47,3° C ein Wert von 0,014 min^{-1} bestimmt [94]. Daß man bei pH-Werten um 2 fast ausschließlich das Anhydrid erhält , liegt daran , daß IV in wässriger Lösung in einem Gleichgewicht mit der Dicarbonsäure V steht , das bei pH 2 zu fast 90 % , bei pH 4

zu etwa 60 % und bei pH 8 zu etwa 1% auf der Seite des Anhydrids liegt. Die Reaktion verläuft daher nach folgendem Mechanismus :

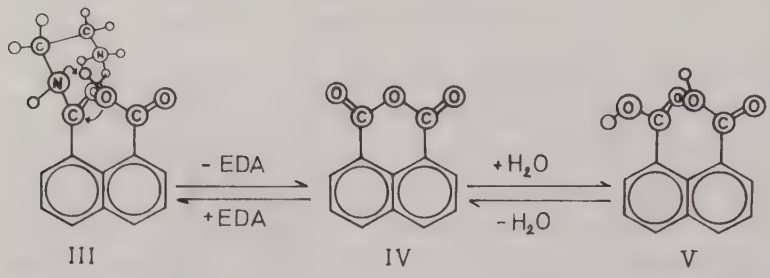
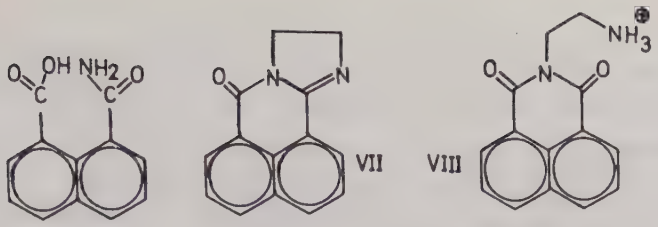


Abb. 29 Mechanismus der Hydrolyse von N-(2-Aminoäthyl)-naphthalsäuremonoamid. Die halbschematische Darstellung zeigt die nahzu idealen sterischen Voraussetzungen für den Angriff der Carboxylgruppe und die Übernahme eines Protons durch den Amidstickstoff. Weiterhin ist eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen der Aminogruppe und dem Carbonylsauerstoff der Amidfunktion angedeutet.

Bemerkenswert ist, daß Naphthalin-1,8-dicarbonsäuremonoamid (VI) unter den Bedingungen der Hydrolyse von III stabil sein soll und sogar ohne Veränderung mit verdünnten wässrigen Mineralsäuren gekocht werden kann [99]. Wir haben diese Angaben noch nicht nachgeprüft, da sich VI durch Ammonolyse des Anhydrids IV nicht darstellen läßt und nur auf Umwegen zu erhalten ist. Treffen sie zu, kann der enorme Unterschied in den Stabilitäten von III und VI nur durch die Beteiligung der Ammoniumgruppe von III an der Katalyse erklärt werden. Molekülmodelle zeigen, daß sich die $NH_3^{\oplus}$ - Gruppe dem Carbonylsauerstoff ideal annähern läßt und diese durch Übertragung



VI VII VIII

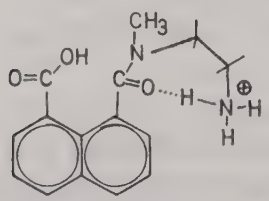
eines Protons oder über eine H-Brücke aktivieren kann. Ihre Wirkung wäre dann ein Analogon zur Funktion der hypothetisch-en Gruppe -Z-H des Enzyms.

Die Untersuchung des Mechanismus der Hydrolyse von III wird dadurch erschwert, daß sich bei höheren pH-Werten neben dem Anhydrid IV ein hydrolysestabiles Produkt bildet, dessen Absorptionsspektrum dem von IV ähnelt (λ_{max} = 344 nm). Die Verbindung ist wie III Ninhydrin-positiv und wandert bei der Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel : Butanol/Eisessig/ Wasser 4/1/1) zwischen III und IV . Beim Kochen in Eisessig oder beim trockenen Erhitzen geht sie in die bereits von BISTRZYCKI und RISI beschriebene Verbindung VII über. Man muß ihr daher die Struktur VIII zuschreiben. Die Bildung cyclischer Imide im Alkalischen ist auch für Phthalsäurehalbamid [100] und für das Amid VI [99] beschrieben.

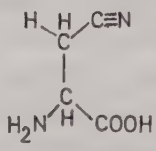
Bei pH 4,2 entstehen aus III bereits 50 % VIII , bei pH-Werten von 8 und höher erhält man das Imid in quantitativer Ausbeute. Um die Funktion der Aminogruppe von III bei der Amidhydrolyse zu klären, müßte man daher von der N-methylierten Verbindung IX ausgehen . Weitere Informationen könnte ein Vergleich des Verhaltens von IX mit dem des entsprechenden Hexamethylendiamin-Derivates bringen.

5.4.5 Überaschend war der Befund von LAUINGER und RESSLER, daß Asparaginase die Hydrolyse von ß-Cyanoalanin (X) , dem Mononitril der Asparaginsäure , katalysiert [27]. Man muß an-

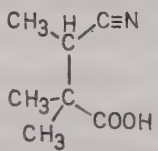
nehmen, daß dabei intermediär Asparagin auftritt. Auch diese Aktivität des Enzyms wird verständlich, wenn man annimmt, daß Cyanoalanin im aktiven Zentrum so gebunden wird, daß die Cyano- und die α - Carboxylgruppe in unmittelbarer Nachbarschaft fixiert sind. Durch eingehende Untersuchungen von WIDEQVIST [100] ist nämlich bekannt, daß die Hydratation von ß - Cyanocarbonsäuren zu den Amiden durch intramolekulare Beteiligung der Carboxylgruppe stark beschleunigt wird, während α- und δ- Cyanosäuren in wässriger Lösung die hohe Stabilität der gewöhnlichen Nitrile zeigen.



IX



X



XI

Auch hier ließ sich nachweisen, daß die Effektivität der COOH - Katalyse durch Substitution mit sperrigen Gruppen und damit eingeschränkter Drehbarkeit der C - C - Bindungen erhöht wird. So wird α, α - Dimethyl - ß - cyanobuttersäure (XI) 24 mal schneller hydratisiert als ß - Cyanopropionsäure [100].

5. 5 Interessant ist ein Vergleich der E. coli-Asparaginase mit einer von HARTMAN [98] untersuchten Glutaminase aus dem gleichen Organismus. Das Enzym zeigt ein pH - Optimum zwischen pH 3, 5 und 5, 5, seine Substratspezifität ist der der Asparaginase weitgehend analog. So werden neben L - Glutamin der γ- Methylester, das γ-Methylamid, das γ - Hydroxamat und das γ - Hydrazid der L - Glutaminsäure umgesetzt. Keine Aktivität wurde dagegen mit D - Glutamin, L - und D - Asparagin sowie mit L - 2- Amino - 4 - cyanobuttersäure beobachtet. Auch die Hydroxylamino -

lyse der Substrate unter Bildung von L-Glu-γ-hydroxamat wird durch das Enzym katalysiert. Die Bindung von 6-Diazo-5-oxo-norleucin (DON) macht die Existenz von zwei aktiven Zentren wahrscheinlich.

HARTMAN schlägt aufgrund dieser und weiterer Befunde einen Mechanismus für die Glutaminase vor, der als geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Hin- und Rückreaktion die langsame Isomerisierung der ES- bzw. EP-Komplexe enthält, also ebenfalls kein Acylenzym postuliert. Wir halten es andererseits für denkbar, daß auch bei diesem Enzym intermediär Glutaminsäureanhydrid gebildet wird. Allerdings ist die Bildung von Anhydrid aus Glutaminsäurederivaten weit weniger begünstigt, als die entsprechende Reaktion von Asparaginsäureverbindungen. (Vgl. [95]). Eine Entscheidung zwischen beiden Mechanismen läßt sich auch im Falle der Asparaginase noch nicht treffen. In weiteren Experimenten muß daher versucht werden, das postulierte Anhydrid-Zwischenprodukt direkt nachzuweisen und mit schnellen Techniken einzelne Schritte im katalytischen Prozeß isoliert zu untersuchen.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] BROOME, J. D. (1961), Nature 191, 1114-1115.

[2] GRUNDMANN, E. (1969), Klin. Wschr. 47, 58-64.

[3] MARQUARDT, H. (1969), Arzneimittelforschung 18, 1380-1386.

[4] COONEY, D. A. u. HANDSCHUHMACHER, R. E. (1970), Annu. Rev. Pharmacol. 10, 421-449.

[5] MASHBURN, L. T. u. WRISTON, J. C. (1964), Arch. Biochem. 105, 450-452.

[6] SCHWARTZ, J. H., REEVES, J. H. u. BROOME, J. C. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 56, 1516-1519.

[7] CAMPBELL, J. A., MASHBURN, L. T., BOYSE, E. A. u. OLD, L. J. (1967), Biochemistry 6, 721-730.

[8] ROBERTS, J., BURSON, G. u. HILL, J. M. (1968), J. Bacteriol. 95, 2117-2123.

[9] TANAKA, M., KAGAWA, T., TATANO, T., MOCHIZUKI, K., NAKAMURA, N., KOHAGURA, M. u. HILL, J. M. (1971), Proc. 6th Intern. Congr. Chemotherapy, Tokyo , S. 260.

[10] WHELAN, H. A. u. WRISTON, J. C. (1969), Biochemistry 8, 2386-2393.

[11] ARENS, A., RAUENBUSCH, E., IRION, E., WAGNER, O., BAUER, K. u. KAUFMANN, W. (1970), Z. Physiol. Chem. 351, 197-212-

[12] HO, P. P. K., MILIKIN, E. B., BOBBITT, J. L., GRINNAN, E. L., BURCK, P. J., FRANK, B. H., BOECK, L. V. D. u. SQUIRES, R. W. (1970), J. Biol. Chem. 245, 3708-3715.

[13] WRISTON, J. C. in The Enzymes (BOYER, P. D. , Hrsg.) 3. Auflage, Bd. 4 , S. 101-121, Academic Press, New York.

[14] KIRSCHBAUM, J., WRISTON, J. C. u. RATYCH, O. T. (1969), Biochim. Biophys. Acta 191, 161-169.

[15] SCHOLTAN, W. u. LIE, S. Y. (1971), Biochim. Biophys. Acta. 236, 105-126.

[16] GLOSSMANN, H. u. BODE, W. (1971), Z. Physiol. Chem. 352, 132-136.

[17] IRION, E. u. VOIGT, W. H. (1970), Z. Physiol. Chem. 351, 1154-1157.

[18] EPP, O., STEIGEMANN, W., FORMANEK, H. u. HUBER, R. (1971), Eur. J. Biochem. 20, 432 - 437.

[19] FRANK, B.H., PEKAR, A.H., VEROS, A.J. u. HO, P.P.K. (1970), J. Biol. Chem. 245, 3716 - 3724.

[20] JACKSON, R.C. u. HANDSCHUHMACHER, R.E. (1970), Biochemistry 9, 3585 - 3590.

[21] NISHIMURA, Y., MAKINO, H., TAKENAKA, O. u. INADA, Y. (1971), Biochim. Biophys. Acta 227, 171 - 179.

[22] CAMPBELL, H.A. u. MASHBURN, L.T. (1969), Biochemistry 8, 3768 - 3775.

[23] RÖHM, K.-H. (1970), Biochemische Diplomarbeit, Tübingen.

[24] EHRMAN, M., CEDAR, H. u. SCHWARTZ, J.H. (1971), J. Biol. Chem. 246, 88 - 94.

[25] NAKAMURA, N,. MORIKAWA, Y. u. TANAKA, M. (1971), Agr. Biol. Chem. 35, 742 - 74.

[26] FROHWEIN, Y.Z., FRIEDMAN , M., REIZER, J. u. GROSSOWICZ, N. (1971), Nature (New Biology) 230, 158 - 159.

[27] LAUINGER, C. u. RESSLER, C. (1970), Biochim. Biophys. Acta 198, 316 - 323.

[28] TAKENAKA, O., TAMURA, Y., NISHIMURA, Y. u. INADA, Y. (1971), J. Biochem. (Tokyo) 69, 1139 - 11.

[29] HANDSCHUHMACHER, R.E., BATES, C.J., CHANG, P.K., ANDREWS, A.T. u. FISCHER, C.A. (1968), Science 161, 62-63.

[30] IRION, E., ARENS, A., RAUENBUSCH, E., BAUER, K., WAGNER, O., BIERLING, R. u. PUETTER, J., zit. nach Chem. Abstr. 73 (1970), 31 925s.

[31] IRION, E., BAUER, K., WAGNER, O., BIERLING, R. u. PUETTER, J., zit. nach Chem. Abstr. 75 (1971), 59 121s.

[32] WAGNER, O., IRION, E., ARENS, A. u. BAUER, K. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 383 - 392.

[33] BROOME, J.D. (1968), Trans. N.Y. Acad. Sci. 30, 690.

[34] GROSSOWICZ, N., WAINFAN, E., BOREK, E. u. WAELSCH, H. (1950), J. Biol. Chem. 187, 111 - 125.

[35] MEISTER, A., LEVINTOW, L., GREENFIELD, R.E. u. ABENDSCHEIN, P.A. (1955), J. Biol. Chem. 215, 441 - 460.

[36] DE GROOT, N. u. LICHTENSTEIN, N. (1960), Biochim. Biophys. Acta 40 , 92 - 98.

[37] BERNHARD, S. A., COLES, W. C. u. NOWELL, J. F. (1960), J. Amer. Chem. Soc. 82, 3043 - 3050.

[38] EPAND, R. M. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 313 - 318.

[39] KEZDY, F. J., CLEMENT, G. E. u. BENDER, M. L. (1963), J. Biol. Chem. 238, PC 3141 - 3143.

[40] ARION, W. J. u. NORDLIE, R. J. (1964), J. Biol. Chem. 239, 2752 - 2757.

[41] FOLK, J. E. (1969), J. Biol. Chem. 244, 3707 - 3713.

[42] DE GROOT, N. u. LICHTENSTEIN, N. (1959), Bull. Research Council Israel 8A, 116 - 117.

[43] WALTER, R., SCHWARTZ, I. L., TRAUTH, L. J., BERMAN, M. C. u. SCHLESINGER, D. H. (1966), Can. J. Chem. 44, 2348 - 2351.

[44] ROBERTS, E. u. HUNTER, P. F. (1953), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 720 - 721.

[45] SCHWARZ, H., BUMPUS, F. M. u. PAGE, I. H. (1957), J. Amer. Chem. Soc. 79, 5697 - 5703.

[46] GRASSMANN, W. u. WÜNSCH, E. (1958), Chem. Ber. 91, 449 - 455.

[47] SMITH, E. L. u. SPACKMAN, D. H. (1955), J. Biol. Chem. 212, 271 - 299.

[48] BENOITON, L. (1962), Can. J. Chem. 40, 570 - 572.

[49] FISCHER, E. u. KOENIGS, E. (1904), Ber. Dtsch. Chem. Ges. 37, 4585 - 4603.

[50] MILLER, H. K. u. WAELSCH, H. (1952), Arch. Biochem. Biophys. 35, 176 - 183.

[51] BISTRZYCKI, A. u. RISI, J. (1925), Helv. Chim. Acta 8, 810 - 820.

[52] GOA, J. (1953), J. CLIN. Lab. Invest. 5, 218.

[53] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. u. RANDALL, R. J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

[54] MAURER, H. R. (1968), Disk-Elektrophorese. S. 42 - 43, de Gruyter, Berlin.

[55] KOJIMA, Y. u. WACKER, W. E. C. (1969), J. Lab. Clin. Med. 47, 521 - 526.

[56] KUN, E. u. KEARNEY, E. B. (1970) in Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER, H. U., Hrsg.) 2. Aufl., Bd. 2, S. 1749 - 175, Verlag Chemie, Weinheim.

[57] FREAR, D. S. u. BURELL, R. C. (1955), Analyt. Chem. 27, 1664 - 1665.

[58] BHADURI, A. S. u. RAY, P. (1957), Z. Anal. Chem. 154, 103 - 113.

[59] DUTTA, R. L. (1958), J. Indian Chem. Soc. 35, 243 - 250.

[60] GOOD, N. E., WINGET, G. D., WINTER, W., CONOLLY, T. N., IZAWA, S. u. SINGH, R. M. M. (1966), Biochemistry 5, 467 - 477.

[61] LIPMANN, F. u. TUTTLE, L. C. (1945), J. Biol. Chem. 159, 21 - 28.

[62] LINEWEAVER, H. u. BURK, D. J. (1934), J. Amer. Chem. Soc. 56, 658.

[63] HUNTER, A. u. DOWNS, C. E. (1945), J. Biol. Chem. 157, 427 - 446.

[64] JENCKS, W. P. (1958), J. Amer. Chem. Soc. 80, 4581 - 4584.

[65] JENCKS, W. P. (1958), J. Amer. Chem. Soc. 80, 4585 - 4588.

[66] GROSSOWICZ, N. u. HALPERN, Y. S. (1957), J. Biol. Chem. 228, 643 - 653.

[67] DE GROOT, N. u. LICHTENSTEIN, N. (1960), Biochim. Biophys. Acta 40, 99 - 110.

[68] ELDRIDGE, N. T. u. ROBERTSON, W., VAN, B. (1965), Anal. Biochem. , 13, 385 - 389.

[69] BENDER, M. L., CLEMENT, G. E., KEZDY, F. J. u. HECK, H. A. (1964), J. Amer. Chem. Soc. 86, 3680 - 3690.

[70] JENCKS, W. P. (1969), Catalysis in Chemistry and Enzymology, Mc-Graw-Hill, New York.

[71] MEANS, G. E. u. FEENEY, R. E. (1971) Chemical Modification of Proteins, Holden-Day Inc., San Fransisco.

[72] SCHOELLMANN, G. u. SHAW, E. (1963), Biochemistry, 2, 252 - 255.

[73] GOLD, A. M. (1965), Biochemistry 4, 897 -901.

[74] HORTON, H. R. u. KOSHLAND, D . E. (1967) in Methods in Enzymology (HIRS, C. W. H., Hrsg) Bd. 11, S. 856 - 866, Academic Press, New York.

[75] GROS, C. u. LABOUESSE, B. (1969), Eur. J. Biochem. 7 , 463 - 470.

[76] CHEN, R. F. (1968), Anal. Biochem. 25, 412 - 416.

[77] SOKOLOVSKY, M., RIORDAN, J.F. u. VALLEE, B.L. (1966), Biochemistry 5, 3582 - 3589.

[78] SOKOLOVSKY, M., RIORDAN J.F. u. VALLEE, B.L. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 20 - 25.

[79] MÜHLRAD, A., CORSI, A. u. GRANATA, A.L. (1968), Biochim. Biophys. Acta 162, 435 - 443.

[80] VINCENT, J.P., LADZUNSKI, M. u. DELAAGE, H. (1970), Eur. J. Biochem. 12, 250 - 257.

[81] MÜHLRAD, A., HEGYI, G. u. TOTH, G. (1967), Acta. Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 19 - 29

[82] MELCHIOR, W.B. u. FAHRNEY, D. (1970), Biochemistry, 9, 251 - 258.

[8 3] RIORDAN, J.F. u. VALLEE, B.L. (1967) in Methods in Enzymology (HIRS, C.H.W., Hrsg.) Bd. 11, S. 570 - 576, Academic Press, New York.

[84] PAULY, H. (1904), Z. Physiol. Chem. 42, 508.

[85] SOKOLOVSKY, M. u. VALLEE, B.L. (1966), Biochemistry, 5, 3574 - 3581.

[86] SOKOLOVSKY, M. u. VALLEE, B.L. (1967), Biochemistry, 6, 700 - 708.

[87] GORECKI, M., WILCHEK, M. u. PATCHORNIK, A. (1971), Biochim. Biophys. Acta 229, 590 - 595.

[88] HOARE, D.G. u. KOSHLAND, D.E. (1967), J. Biol. Chem. 242, 2447 - 2453.

[89] BRAY, G.A, (1960), Anal. Biochem. 1, 279 - 285.

[90] ALLISON, J.P., MANDY, W.J. u. KITTO, G.B. (1971), FEBS-Lett. 14, 107 - 108.

[91] MOR, G. u. LICHTENSTEIN, N. (1969); FEBS-Lett. 3, 313 - 314.

[92] BULL, H.B. u. BREESE, K. (1968), Arch. Biochem. Biophys. 128, 497 - 502.

[93] BRUICE, T.C. u. BENKOVIC, S.J. (1966), Bioorganic Mechanisms, Benjamin, New York.

[94] BENDER, M.L., CHOW, Y.L. u. CHLOUPEK, F. (1958), J. Amer. Chem. Soc. 80, 5380 - 5384.

[95] BRUICE, T.C. u. PANDIT, U.K. (1960), J. Amer. Chem. Soc. 82, 5858 - 5864.

[96] THANASSI, J.W. u. BRUICE (1966), J. Amer. Chem. Soc. 88 , 747 - 752.

[97] FERSHT, A. R. (1971), J. Amer. Chem. Soc. 93, 3504-3515

[98] HARTMAN, S. C. (1971) in The Enzymes (BOYER, P. D., Hrsg.), 3. Aufl., Bd. 4, S. 79 - 100, Academic Press, New York.

[99] CARONNA, G. (1949), Gazz. Chim. Ital. 79, 603 - 608.

[100] WIDEQVIST, S. (1951), Arkiv för Kemi 3, 289 - 301.

ANHANG I

Ableitung der Gleichung III, S. 8

Unter der Voraussetzung, daß alle Zwischenprodukte der Katalyse während der Aktivitätsbestimmung in konstanten steady - state - Konzentrationen vorliegen, kann man ansetzen.

$$(1)\quad d[ES]/dt = k_1[E][S] + k_{-2}[F][A] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

$$(2)\quad d[F]/dt = k_2[ES] - (k_w[W] + k_n[N] + k_{-2}[A])[F] = 0$$

und

$$(3)\quad [E]_o = [E] + [ES] + [F]$$

Zunächst erhält man aus (2) durch Umordnen

$$(4)\quad \frac{[F]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_w[W] + k_n[N] + k_{-2}[A]}$$

Nun wird [E] aus (3) in (1) eingesetzt. Durch Auflösen nach [ES] ergibt sich

$$(5)\quad [ES] = \frac{k_1[S][E]_o + [F](k_{-2}[A] - k_1[S])}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}$$

Schließlich wird [ES] durch Einsetzen von (5) in (4) eliminiert. Durch Auflösen nach [F] und Umordnen erhält man Gleichung III, die in der Form der MICHAELIS - MENTEN - Gleichung dargestellt ist.

Gleichung VII, S. 9 ergibt sich ohne zusätzliche Voraussetzungen durch Umordnen aus den Gleichungen III und V.

Anhang II

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen

AHM	L - Asparaginsäure - ß - hydroxamat
Asp -	Asparaginsäure -
BICIN	N, N - Bis-(2-hydroxyäthyl) glycin
CBO -	N^{α} - Carbobenzoxy -
CFQ	Monochlor-trifluor-p-benzochinon
CMC	N-Cyclohexyl-N-(ß-[N'-methylmorpholino]-äthyl) carbodiimid - p -toluolsulfonat
DEP	Diäthylpyrocarbonat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DHT	Diazo -1H - tetrazoliumchlorid
DONV	5 - Diazo - 4-oxo - norvalin
GDH	Glutamat - Dehydrogenase (EC 1. 4. 1. 2)
GOT	Aspartat - Aminotransferase (EC 2. 6. 1. 1)
MDH	Malat - Dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 37)
MES	N - Morpholino - 2 - äthansulfonsäure
MOPS	N - Morpholino - 3 - propansulfonsäure
NACI	N - Acetylimidazol
NADH	ß - Nicotinamid-adenin - dinucelotid (red.)
TEA	Triäthanolamin
TNM	Tetranitromethan
TRIS	Tris - (hydroxymethyl) aminomethan
ZPNIA	CBO - L - Isoasparagin - p - nitrophenyl-ester

Die in den kinetischen Gleichungen verwendeten Abkürzungen sind auf den Seiten 7 - 10 sowie 26 - 27 erläutert. Fehlt bei optisch aktiven Verbindungen die Konfigurationsangabe, ist stets die L - Form gemeint.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Kinetische Experimente zum Mechanismus der Asparaginase aus E. coli stehen im Einklang mit einem Reaktionsschema, in dem als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Katalyse die Bildung eines allen Substraten gemeinsamen und nicht mit dem ES-Komplex identischen Zwischenprodukts F enthalten ist. Untersucht wurde insbesondere

a) die Kinetik der Hydrolyse und/oder die Inhibitoreigenschaften von Derivaten und Analogen des L-Asparagins (D-Asparagin, L-Glutamin, L-Asp-ß-hydroxamat, L-Asp-ß-methylamid, L-Asp-ß-hydrazid, L-Asp-ß-methylester, L-Asp-ß-äthylester, L-Asp-ß-benzylester, L-Asp-dimethylester, L-Asp-diamid, DL-α-Chlorsuccinamid, DL-N^{α}-Äthylasparagin, CBO-L-Asparagin, N^{α}-Chloracetyl-L-asparagin, Glycyl-L-asparagin, L-Asparaginyl-glycin und L-Isoasparagin)

b) die Kinetik der enzymatischen Hydroxylaminolyse von L-Asparagin und ihre pH-Abhängigkeit; hierzu wurde ein Verfahren entwickelt , das es gestattet die Synthese von Hydroxamsäuren in neutraler Lösung kontinuierlich zu verfolgen

c) die Kinetik der Produkthemmung durch Ammoniak und

d) die der enzymatischen Synthese von Asparagin aus Asp-ß-hydroxamat.

2. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich durch eine aus dem formalen Reaktionsschema abgeleitete vereinfachte Geschwindigkeitsgleichung befriedigend beschreiben und führen zu folgenden Aussagen über die Rolle von funktionellen Gruppen der Substrate:

a) An der Bildung des ES-Komplexes sind die α-Aminogruppe und die Acylfunktion der Substrate beteiligt.

b) Die α-Carboxylgruppe der Substrate greift im Laufe der Katalyse nucleophil am Carbonylkohlenstoff des Acylrestes an. Unter Abspaltung von Amin oder Alkohol entsteht als Zwischenprodukt F enzymgebundenes Asparaginsäureanhydrid.

3. Durch selektive chemische Modifizierung des Enzymproteins läßt sich zeigen, daß OH-Gruppen des Serins und Tyrosins sowie freie Carboxyl- und Aminogruppen, soweit sie mit den verwendeten Reagenzien erfaßbar sind, für die Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität nicht essentiell sein können. Dagegen wird die Aktivität durch Modifizierung von zwei Histidinresten der Asparaginase vollständig zerstört.

Diese Befunde und Literaturdaten machen es unwahrscheinlich, daß es sich bei dem aus der Kinetik abgeleiteten Species F um ein kovalentes Acylenzym handelt und stützen damit unsere Vorstellungen über die Natur von F.

4. Als nichtenzymatische Modellreaktion für den vorgeschlagenen Mechanismus wird die reversible Hydrolyse eines Säureamids beschrieben, die in schwach saurer Lösung unter intramolekularer nucleophiler Beteiligung einer benachbarten Carboxylgruppe über ein cyclisches Säureanhydrid verläuft.

LEBENSLAUF

Am 23. 8. 1943 wurde ich, Klaus-Heinrich Röhm, als Sohn des Dr. Helmut Röhm und seiner Frau Marianne, geb. Hanselmann in Stuttgart geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Stuttgart-Birkach, danach das Progymnasium Stuttgart-Hohenheim und von 1958 bis 1962 die Evangelisch-theologischen Seminare in Schöntal/Jagst und Urach. Dort legte ich 1962 das Abitur ab.

Ab SS 1962 studierte ich an der Universität Tübingen Physik und Biochemie. Die Vorprüfungen im Fach Biochemie legte ich 1964 und 1967, die Diplomprüfung im Jahre 1969 ab. Von Mai 1969 bis Januar 1970 arbeitete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider über die Kinetik der Asparaginase aus Escherichia coli.

Die vorliegende Arbeit setzt diese Untersuchungen fort. Sie wurde - ebenfalls unter Anleitung von Herrn Prof. Schneider - in der Zeit von Mai 1970 bis Dezember 1971 am Physiologisch-chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg/Lahn durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider danke ich für die verständnisvolle und großzügige Förderung der vorliegenden Untersuchungen und für zahlreiche wertvolle Diskussionen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten : E. Bayer, E. Bünning, K. G. Grell, M. Hanack, H. Kneser, G. Kortüm, H. Krüger, H. Mauser, K. D. Mörike, G. Möllenstedt, Eu. Müller, W. Nultsch, W. Rüdorff, Fr. Schneider, W. Vogel, G. Weitzel, H. Wieland, H. Zähner.